

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
der Philipps-Universität Marburg**
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Arnold
Klinik für Innere Medizin
Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. med. Neubauer

Optimierung eines Verfahrens zum Nachweis erhöhter Telomeraseaktivität in zytologischem Punktionsmaterial



INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER GESAMTEN MEDIZIN

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
SUSANNE MEYER-NEUMÜHLEN
aus Frankfurt am Main
Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

am 28. 11. 2002

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. Schuermann

Korreferent Prof. Dr. Dr. Seifart

gewidmet

meinen Eltern

und

Jochen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Telomere	2
1.1.1	Lokalisation und Struktur der Telomere	2
1.1.2	Funktion der Telomere	5
1.1.2.1	Telomere zum Schutz der Chromosomen	5
1.1.2.2	Die Rolle der Telomere bei der Meiose und Mitose	7
1.1.2.3	Telomere als Replikationskontrolle	8
1.2	Telomerase	10
1.2.1	Vorkommen der Telomerase beim Menschen	10
1.2.2	Struktur und Funktion humaner Telomerase	10
1.2.2.1	Die RNA-Untereinheit	11
1.2.2.2	Die Proteinuntereinheiten hTERT und hTAP1	12
1.2.2.3	Funktion der Telomerase	13
1.2.3	Die molekulare Regulation der Telomeraseaktivität	16
1.2.3.1	Regulierung der Genexpression	17
1.2.3.2	Regulierung durch Splicingvarianten	18
1.2.3.3	Postrtranslationale Regulierung	18
1.2.4	Alternative Mechanismen zur Telomerlängenstabilisierung	20
1.3	Nachweis von Telomeraseaktivität	21
1.3.1	Telomerlänge	21
1.3.2	Expressionsbestimmung von hTR und hTERT	21
1.3.3	Messung der Telomeraseaktivität	22
1.4	Ziel der Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Enzyme, Fertigpuffer und Nucleinsäuren	26
2.1.3	Kits und Sonstiges	27
2.1.4	Puffer und Lösungen	27
2.1.5	Geräte und Zubehör	28
2.1.6	Zelllinien humaner Tumoren	30
2.1.7	Patientenmaterial	31
2.1.7.1	Bronchoskopisch gewonnene Sputen und Lavageproben	31
2.1.7.2	Sputen von Station	34

2.1.7.3	Pleuraergüsse und Aszites	34
2.1.7.4	Perikardergüsse	35
2.1.7.5	Oligonucleotide	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	Proteinextraktion	38
2.2.1.1	Proteinextraktion aus Zelllinien	38
2.2.1.1.1	Extraktion aus adhärenen Zellen	38
2.2.1.1.2	Extraktion aus nicht adhärenen Zellen	39
2.2.1.1.3	Zellzählung	39
2.2.1.2	Proteinextraktion aus Sputum und Lavage	40
2.2.1.3	Proteinextraktion aus Punktionsproben	40
2.2.1.3.1	Waschschritt mit RCLB	41
2.2.1.3.2	Durchführung der Extraktion	41
2.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	42
2.2.3	Alkalische Phosphatase Enzymkinetik	43
2.2.4	TRAP-Assay im Allgemeinen	44
2.2.4.1	Telomerase Extensionsschritt	45
2.2.4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
2.2.5	TRAP-Assay im Speziellen	47
2.2.5.1	Kinasierung des TS-Primers	47
2.2.5.2	Ansatz eines TRAP-Assays	48
2.2.5.3	PCR mit Interner Kontrolle	51
2.2.6	Gelelektrophorese	52
2.2.6.1	Allgemeine Beschreibung der Gelelektrophorese	52
2.2.6.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	53
2.2.7	Kinasierung des DNA-Längenstandards	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Etablierung und Optimierung des TRAP-Assays	55
3.1.1	Proteinextraktion	55
3.1.1.1	Optimierung und Durchführung der Proteinextraktion	55
3.1.1.2	Messung eines Referenzenzym	59
3.1.2	Optimierung des TRAP-Assays	59
3.1.2.1	Detektionsmethoden	59
3.1.2.2	Primer und TRAP-Puffer	61
3.1.2.3	PCR	63
3.1.2.4	Elektrophorese	67
3.2	Ergebnisse der Patientenproben	68
3.2.1	Sputen und Lavageproben aus der Bronchoskopie	68
3.2.2	Sputen von Patienten auf Station	72

3.2.3	Pleurapunktionen	73
3.2.4	Aszitespunktionen.....	75
3.2.5	Perikardpunktionen	77
3.2.6	Blutproben.....	79
4	Diskussion	80
4.1	Methodische Störfaktoren	80
4.1.1	Die Proteinextraktion	81
4.1.2	Qualitätsbestimmung des Proteinextraktes	82
4.1.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	83
4.1.4	Die Komplexität des TRAP-Assays	84
4.1.4.1	Varianten des TRAP-Assays im Vergleich.....	84
4.1.4.2	Störfaktoren bei der Durchführung des TRAP-Assays	87
4.1.5	Gelelektrophorese	89
4.1.6	Untersucherabhängigkeit und Entscheidungskriterien.....	89
4.2	Untersuchung der Patientenproben auf Telomeraseaktivität.....	91
4.2.1	Sputen und Lavagen der Bronchoskopie	91
4.2.2	Sputum von Patienten auf Station	95
4.2.3	Pleura- und Aszitespunktionen	96
4.2.4	Perikardpunktionen	98
4.2.5	Blutproben.....	99
5	Zusammenfassung	100
6	Abkürzungen	102
7	Literaturverzeichnis	103

Anhang

1 Einleitung

Krebserkrankungen sind in unserer heutigen Gesellschaft hinter Herz-Kreislaufferkrankungen die zweithäufigste Todesursache des Menschen. In bestimmten Altersschichten - wie bei den Kindern und Jugendlichen - ist Krebs sogar die führende natürliche Todesursache (LANDIS et al. 1999). Die Prognose ist bei bestimmten Arten von Krebserkrankungen trotz vielseitiger Behandlungsmöglichkeiten infaust. Sie ist vor allem von der Erkennung der malignen Erkrankung in einem frühen Stadium abhängig. Eine Behandlung in dieser Phase der Krankheit könnte mit größerer Effektivität und geringerer Toxizität erfolgen. Eine erfolgreiche Früherkennung könnte so Morbidität und Mortalität verringern (FONTANA et al. 1975, STRAUSS et al. 1995, MOSS 1999, BLANKS et al. 2000, DUDHAT et al. 2000, SCHNEIDER et al. 2000). Auf dem Gebiet der Malignomdetektion hat es in den letzten Jahrzehnten viele Weiterentwicklungen gegeben. Dabei sind verbesserte bildgebende Verfahren wie zum Beispiel das CT, MRT oder neue Ultraschalltechniken zum Einsatz gekommen. Trotzdem sucht der Großteil der Patienten erst dann einen Arzt auf, wenn sich Symptome aufgrund seiner Tumorerkrankung entwickelt haben. Zusätzlich verdrängen viele Patienten ihre Beschwerden und wagen einen Arztbesuch erst, wenn die Erkrankung bereits weit fortgeschritten ist. Bei bestimmten onkologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel beim Bronchialkarzinom, kann zu diesem Zeitpunkt bereits eine Metastasierung stattgefunden haben, die wiederum die Prognose des Patienten stark verschlechtert. Einfach durchzuführende Screeningmethoden könnten diese Situation verbessern. Eine Anwendungsmöglichkeit dieser Methoden wäre die Untersuchung von Hochrisikogruppen bestimmter Karzinome (wie zum Beispiel Raucher beim Bronchialkarzinom) in regelmäßigen Abständen ohne größeren Aufwand und ohne großem Komplikationsrisiko für den Patienten. Mit den bisher angewendeten Methoden der Diagnostik und bildgebenden Verfahren, wie sie oben erwähnt wurden, ist die Diagnose eines Tumors häufig erst möglich, wenn dieser eine bestimmte makroskopisch erkennbare Größe erreicht hat. Gleichzeitig kann im nächsten Schritt eine Unterscheidung zwischen einem malignen und benignen Tumor ohne Biopsie und mikroskopischer Untersuchung nicht vorgenommen werden. So hat man die Forschung in Richtung der molekularbiologischen Seite erweitert, um die molekularen Mechanismen der Tumorgenese aufzudecken und darüberhinaus alternative Methoden einer Krebsfrüherkennung zu entwickeln. Es wurden außerordentliche Ergebnisse erzielt, die maßgeblich zum Verständnis der Krebsentstehung beigetragen haben. Man hat vor allem nach potentiellen Markern gesucht, die mit hoher Sensitivität und Spezifität aber doch mit nur geringem Aufwand eine Frühdiagnostik ermöglichen könnten. Die potentiellen

Tumormarker sollten also in Materialien bestimmbar sein, die für Patient und Arzt relativ einfach zu gewinnen sind. Der Einsatz sogenannter minimalinvasiver Methoden spielt in dieser Hinsicht eine immer größer werdende Rolle. Außerdem sollte der Marker tumorspezifisch sein, das heißt, er sollte nicht in normalen sondern nur in malignen Zellen zu detektieren sein.

Im Rahmen der Aufdeckung bestimmter genetischer Veränderungen, die bei der Tumorentstehung stattfinden, hat man auch die Enden der Chromosomen - die *Telomere* - untersucht. So weiß man heute, daß die Telomere eine wichtige Rolle unter anderem bei der Zellalterung und beim Überleben transformierter Zellen spielen. Schließlich ist die Identifizierung eines die Telomerlänge stabilisierenden Enzyms gelungen (GREIDER & BLACKBURN 1985). Eine Aktivität dieses Enzyms, der »*Telomerase*«, konnte in 90 % aller untersuchten Tumoren gefunden werden (KIM et al. 1994, SHAY & BACCHETTI 1997). Die Entstehung von Telomeraseaktivität ist auch ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung (POREMBIA et al. 1998), so daß man glaubt, vielleicht einen neuen universellen Tumormarker gefunden zu haben, der die Früherkennung erheblich verbessern könnte.

1.1 Telomere

1.1.1 Lokalisation und Struktur der Telomere

Die Chromosomen im eukaryontischen Zellkern - bestehend aus den linearen kondensierten Strängen der an Proteine gelagerten DNA - besitzen stabilisierende Endstücke, die man *Telomere* nennt (griechisch *telos*, Ende, und *meros*, Teil). Während früher zytologischer und genetischer Studien erkannte man, daß sie den korrekten Bau der Chromosomen stabilisieren und sie so vor Degradation schützen (MÜLLER 1938, MCCLINTOCK 1941). Heute versteht man unter *Telomer* die den Chromosomen endständige repetitive guaninreiche Sequenzen und deren assoziierte Proteine. Sie konnten in allen bisher untersuchten Organismen

nachgewiesen werden. Es handelt sich um hochkonservierte Sequenzen, die sich bei verschiedenen Spezies nur gering unterscheiden (siehe Tabelle 1.1).

Gruppe	Organismus	Telomer-sequenz [3'-5']	Quelle
Säugetiere	<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG	ZAKIAN et al. 1989
Azelluläre Schleimpilze	<i>Physarum polycephalum</i> <i>Didymium iridis</i>	TTAGGG	"
Fadenpilze	<i>Neurospora crassus</i>	TTAGGG	"
Rhizopoda	<i>Trypanosoma</i> <i>Crithidia</i>	TTAGGG	"
Ciliata	<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG	"
	<i>Glaucoma chattoni</i>	TTGGGG	"
	<i>Pramecium</i>	TT(T/G)GGG	"
	<i>Oxytricha</i> <i>Stylonichia</i>	TTTTGGGG	"
Sporozoen	<i>Plasmodium</i>	(C/T)TTGGGA	"
Höhere Pflanzen	<i>Arabidopsis</i>	TTTGGGA	"
Algen	<i>Chlamydomonas</i>	TTTTGGGA	BLACKBURN 1990
Sproßhefe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TGGG	ZAKIAN et al. 1989

Tabelle 1-1: Telomersequenzen in verschiedenen Spezies

Aufgeführt sind die bekannten Telomersequenzen in verschiedenen Spezies. Dabei unterscheiden sich die Sequenzen nur in wenigen Basen. Es sind hochkonservierte Sequenzen, die sich im Laufe der Evolution nur gering verändert haben.

nach: BLACKBURN 1990

Die Sequenz eines Telomers wurde zuerst bei dem Wimperntierchen *Tetrahymena* entdeckt (BLACKBURN & GALL 1978). Bei Vertebraten umfasst die Telomersequenz die Wiederholung der sechs Basen 3'-[TTAGGG] (ZAKIAN 1989). Dabei sind die Telomere niemals gleich lang. Sie unterscheiden sich in ihren Längen in Zellen unterschiedlicher Spezies und in den Zellen desselben Organismus. Das menschliche Telomer umfasst 5-15 Kilobasen telomerischer Sequenzwiederholungen (»Repeats«) (MOYZIS 1988, CROSS 1989, ALLSHIRE et al. 1989). Die Unterschiede in den Längen ergeben sich aus dem Umstand, daß sich Telomere bei jeder Zellteilung verkürzen. Beim Menschen geschieht das in einer Größenordnung von 50 - 200 bp pro Mitose (HARLEY et al. 1990, HASTIE 1990). Dieses Phänomen wird auf zwei Ursachen zurückgeführt:

Die am häufigsten genannte Erklärung bezieht sich auf den Replikationsvorgang der DNA, der jeder Zellteilung vorausgeht. DNA-Polymerasen synthetisieren in [5'→3']-Richtung an die aufgetrennten Elternstränge neue komplementäre Gegenstränge. Sie benötigen dabei kurze RNA-Oligonucleotide (Primer) als Startsequenz. Diese Primer hinterlassen aber am Ende der Replikation nach ihrer Dislokation am 5'-Ende der neu synthetisierten Tochterstränge jeweils eine Lücke, die ohne bestimmte Kompensationsmechanismen nicht

auffällig sind, weil die DNA-Polymerase nur in eine Richtung synthetisieren kann. Durch dieses auch als »Endreplikationsproblem« bekannte Phänomen verkürzen sich die Chromosomen an ihren Telomeren bei jeder Zellteilung (WATSON 1972) (siehe Abbildung 1-1).

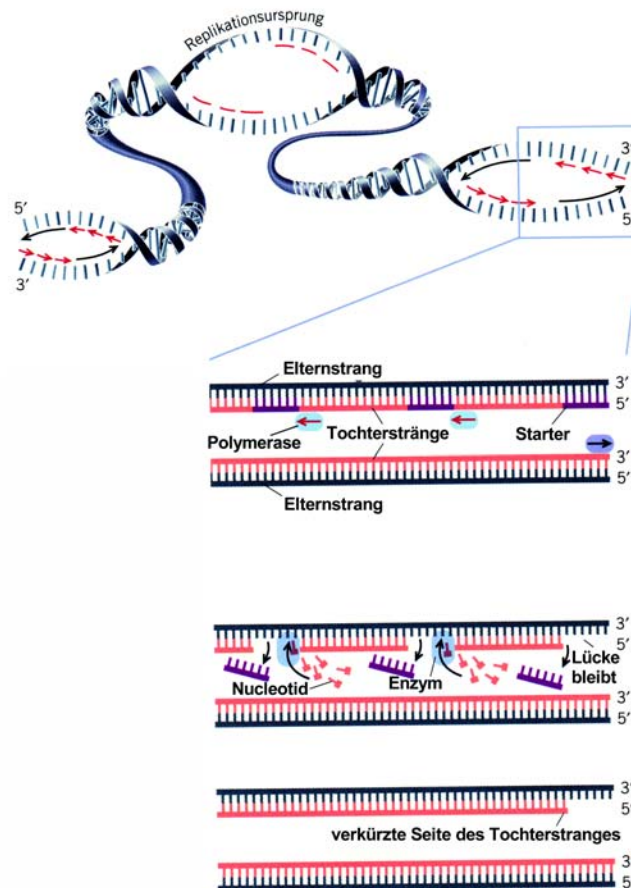


Abbildung 1-1: Das Endreplikationsproblem

Bei der DNA-Replikation im Zellkern synthetisieren DNA-Polymerasen in $[5' \rightarrow 3']$ -Richtung die komplementären DNA-Tochterstränge. Dabei benötigen die DNA-Polymerasen kurze RNA-Stücke (»Starter« oder auch »Primer«) als Startersequenzen, an die sie sich für die DNA-Synthese anlagern. Diese RNA-Primer dislozieren am Ende der Replikation und hinterlassen Lücken im DNA-Strang. Diese Lücken können durch eine andere DNA-Polymerase geschlossen werden. Am Ende beider Tochterstränge bleibt aber eine Lücke bestehen, weil hier eine Anlagerung der zweiten DNA-Polymerase nicht möglich ist. So verkürzen sich die neuen DNA-Stränge bei jeder Replikation.

nach: Seward Hung, Scientific American, dt. Ausgabe, Digest »Altern, Krebs und Gene«, 2/1998

Auf diese Weise erklärt man sich auch die Tatsache, daß der von $5'$ nach $3'$ -Richtung verlaufende G-reiche Telomerstrang das Ende seines komplementären Stranges überschreitet, so daß an jedem $3'$ -Ende eine einsträngige Telomersequenz überhängt (KLOBUTCHER et al. 1981, HENDERSON & BLACKBURN 1989, MAKAROV et al. 1997). Beim Menschen umfaßt dieser Überhang 130 bis 210 Basen (MAKAROV et al. 1997). Diese Protrusion von [TTAGGG]-Repeats soll durch die Ablösung des Polymeraseprimers am Ende der Replikation zustande kommen und entspricht der erwähnten Lücke (WRIGHT et al. 1997). Ob

dieser Überhang allerdings generell bei allen menschlichen Chromosomen vorliegt, ist nicht sicher geklärt (MAKAROV et al. 1997, WRIGHT et al. 1997).

Gleichzeitig gibt es noch eine zweite Theorie zur Verkürzung der Telomere und Entstehung dieses 3'-Überhangs. Man hat bei Experimenten mit bestimmten humanen Zellen (primäre und immortale Lungenfibroblasten, Endothelzellen aus Umbilicalvenen und Leukozyten) zu 80-100 % diese 3'-Protrusion an einsträngiger telomerischer DNA beobachten können. Würde dieser Überhang nur durch das Endreplikationsproblem alleine verursacht, so dürften er sich nur bei 50 % der Telomere finden lassen. Deshalb vermutet man, daß eine 5'-3'-Exonuclease (SIEGAL et al. 1992) am komplementären C-reichen Strang reagiert und diesen so verkürzt, so daß am 3'-Ende des Chromosoms eine einsträngige Sequenz zurückbleibt (MAKAROV et al. 1997).

Zur Gesamtstruktur der Telomere zählen aber nicht nur die repetitiven DNA-Sequenzen, sondern auch bestimmte Proteine. Dazu gehören mindestens die zwei bisher identifizierten humanen Telomerbindungsproteine TRF1 und TRF2. Das Protein TRF1 wurde aus HeLa-Zellen isoliert (CHONG et al. 1995). TRF2 wurde wenig später entdeckt und charakterisiert (BROCCOLI et al. 1997, BILAUD et al. 1997). Die Funktion dieser Proteine wird in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben. Beide Proteine werden ubiquitär exprimiert und sind *in vivo* auf den Telomeren lokalisiert, wo sie während des normalen Durchlaufens des Zellzyklus beide gleichzeitig gebunden bleiben (CHONG et al. 1995, BROCCOLI et al. 1997, SMITH & DE LANGE 1997, VAN STEENSEL & DE LANGE Nature 1997).

1.1.2 Funktion der Telomere

1.1.2.1 Telomere zum Schutz der Chromosomen

Früh brachte man die Rolle der Telomere in Zusammenhang mit dem Schutz vor End-zu-End-Aneinanderlagerungen von Chromosomen. Bei Verlust der Telomerschutzkappen kommt es zur Entstehung von dizentrischen Chromosomen, die wiederum im weiteren Verlauf zu Anaphasebrücken und unkontrollierten Strangbrüchen und schließlich zum Zelltod führen können (MULLER 1938, MC CLINTOCK 1941). Durch genauere Kenntnis der Telomerstruktur und Identifizierung von telomerbindenden Proteinen glaubt man, den grundsätzlichen Mechanismus dieses Fusionsschutzes verstanden zu haben. Dabei interagieren TRF1 und TRF2 miteinander. TRF1 bindet als Homodimer an die doppelsträngige telomerische DNA (BIANCHI et al. 1997). Man hat beobachten können, daß sich die DNA im weiteren Geschehen umfaltet und dabei die sonst linearen Telomere große Telomerschleifen (*t-loops*) bilden (siehe

Abb. 1-2). Sie können *in vitro* sowie *in vivo* elektronenmikroskopisch beobachtet werden. TRF1 bewirkt bei diesem Vorgang die parallele Anordnung der Duplexstränge zueinander und induziert gleichzeitig die Bildung einer kleinen »Vertiefung« in diesen Duplexsträngen. TRF2 - ebenfalls als Homodimer gebunden an doppelsträngige Telomer-DNA (BROCCOLI et al. 1997) - befindet sich am Berührungspunkt zwischen Schleifenanfang und Telomerende (siehe Abbildung 1-2). An seiner Bindungsstelle bewirkt TRF2 eine kurzstreckige Entwindung der DNA-Doppelhelix und Auftrennung der komplementären Stränge. Dadurch kann der einsträngige G-reiche 3'-Überhang des Telomers an genau dieser Stelle in den Doppelstrang eintauchen und mit einem Strang hybridisieren. Dabei bildet sich, stabilisiert durch TRF2, der sogenannte "Displacement Loop" (*d-loop*), über den die einsträngigen Telomerenden geschützt werden. Er enthält bis zu 300 Nucleotide einsträngiger [TTAGGG]-Repeats. Die Bildung der Loops ist ein architektonischer Mechanismus, den Verlust von kodierenden Sequenzen durch End-zu-End-Fusion, Rekombination und Degradation durch Exonukleasen und Ligasen zu verhindern. Die Größe der t-Loops korreliert stark mit der Telomerlänge (GRIFFITH et al. 1999). Ein Equilibrium aus Bindung von TRF1 und TRF2 und einer ausreichenden Länge von Telomerrepeats spielt für die Ausbildung dieser Loops eine entscheidende Rolle. Bei Verlust von TRF2 kann trotz intakter und ausreichend langer Telomere die Funktion dieses Fusionsschutzes der Chromosomen nicht aufrecht erhalten werden (VAN STEENSEL et al. 1998). Eine Inhibition von TRF2 führt zunächst zu einer Aktivierung von p53 und dadurch anschließend ohne Verlust telomerischer DNA zu sofortigem Zellzyklusarrest und zur Apoptose der Zelle (KARLSEDER et al. 1999). Trotzdem korreliert die Bildung der dizentrischen Chromosomen mit kritisch verkürzten Telomeren sowohl bei seneszenten Zellen als auch bei Tumorzellen (DE LANGE 1995). Das könnte damit zusammenhängen, daß eine Bindung von TRF1 und TRF2 und die Ausbildung der t-Loops

nur unter Vorliegen entsprechend langer, nicht aber bei kritisch verkürzten Telomeren möglich ist (GRIFFITH et al. 1999).

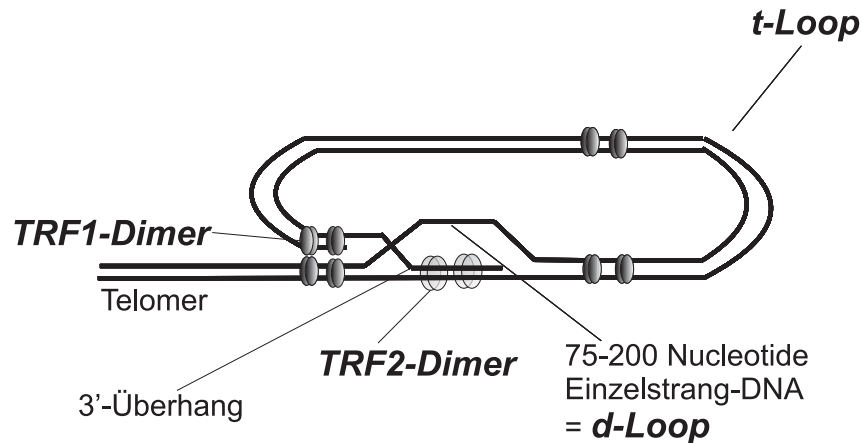


Abbildung 1-2: Ausbildung von t-Loops an den Telomeren

Die Ausbildung der »t-Loops« ist mit Hilfe der beiden telomerbindenden Proteine TRF1 und TRF2 möglich. Beide Proteine binden dabei als Homodimere an doppelsträngige Telomer-DNA. TRF1 bewirkt die parallele Anordnung der Duplexstränge zueinander. TRF2 bewirkt an seiner Bindungsstelle eine kurzstreckige Entwindung und Auftrennung der DNA-Doppelhelix. Dadurch kann der einsträngige 3'-Überhang des Telomers an dieser Stelle in den Doppelstrang eintauchen und mit einem Strang hybridisieren. Dadurch bildet sich hier der »d-Loop« (»Displacement Loop«) (BIANCHI et al. 1997, BROCCOLI et al. 1997, GRIFFITH et al. 1999).

1.1.2.2 Die Rolle der Telomere bei der Meiose und Mitose

Eine weitere wichtige Rolle nehmen die Telomere bei der Meiose, der Bildung von Gameten, ein. Sie sorgen für die korrekte Paarung der homologen Chromosomen und schaffen so die Basis für den Austausch genetischer Informationen durch Rekombination (NIMMO et al. 1998, COOPER et al. 1998). Die Telomere ballen sich bei Säugetieren in der Prophase der Meiose I an einer bestimmten Stelle des Nucleus zusammen und heften sich und die Chromosomen an die Kernmembran. Man spricht vom »*Bouquetstadium*«. Vom Anheftungspunkt ausgehend liegen die Chromosomen ihrer Länge nach nebeneinander vor. Man könnte sie als lange Seile betrachten, die man an einem Ende faßt und schüttelt, so daß sie sich parallel zueinander ausrichten (DE LANGE 1998, BASS et al. 1997, SCHERTHAN et al. 1996). Der genaue Steuerungsmechanismus dieses Effekts ist beim Menschen noch nicht erforscht. *In vitro* scheint aber das telomerbindende Protein TRF1 einen entscheidenden Einfluß auf die parallele Paarung der Telomere zu haben (GRIFFITH et al. 1998). Die schwerwiegenden Konsequenzen, die sich bei Verlust von TRF1 auch beim Menschen ergeben könnten, zeigen mit Sproßhefe durchgeführte Experimente. Bei genetischer Veränderung des telomerbindenden Proteins TRF1 nahm die Rekombination des DNA durch ungenügende Paarung homologer Chromosomen um das 3-10fache ab, während sich gleichzeitig auch die

Fertilität verringerte (NIMMO et al. 1998, COOPER et al. 1998). Telomere sind also auch bedeutsam bei der Bildung fortpflanzungsfähiger Gameten.

Bei der Mitose unterstützen die Telomere auf noch nicht verstandene Weise die vollständige Separation der Schwesterchromosomen während der Anaphase. Dies haben Untersuchungen bei *Tetrahymena thermophila* mit mutierten Telomeren ergeben (KIRK et al. 1997).

1.1.2.3 Telomere als Replikationskontrolle

Alle somatischen Zellen besitzen eine limitierte Teilungsfähigkeit, die ab einer bestimmten Anzahl von Replikationen abnimmt. Sie begeben sich dann in einen Zustand, den man als *Seneszenz* bezeichnet (HAYFLICK 1965). Seneszenz ist eine Erscheinung des Zellalters und korreliert stark mit der Länge der Telomere. (HARLEY et al. 1990, HASTIE et al. 1990). Diese dienen als »mitotische Uhr«, die die Anzahl der Replikationen zählen und ein gewisses Zellalter reflektieren. Telomere in somatischen Geweben sind zum Beispiel bei älteren Menschen im Vergleich zu jüngeren kürzer (LINDSEY et al. 1991). Ihre Länge spiegelt also die Proliferationskapazität von Zellen wieder (HARLEY 1991, ALLSOPP et al. 1992). Sind die Telomere aufgrund multipler Replikationen auf eine kritische Länge verkürzt worden, treten die Zellen - falls sie keine Kompensationsmechanismen besitzen - in einen Zellzyklusarrest ein, mit dem die replikative Seneszenz einhergeht. Die molekularen Details der Signaltransduktion, über die der Übergang in die replikative Seneszenz bei Verkürzung der Telomerlänge gesteuert oder auch verhindert wird, sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Sie werden in ihren bekannten Ansätzen in Zusammenhang mit Telomerase in Kapitel 1.2.3 dargestellt.

Stammzellen sind nicht entdifferenzierte Zellen, die in fast allen Körpergeweben vorkommen, besonders aber in Geweben mit hoher Proliferationsrate (z.B. Epithelien der Haut und des Darms, Knochenmark). Sie sind pluripotent, und aus ihnen entwickeln sich immer wieder neue Zellen, die sich dann entsprechend differenzieren. Stammzellen besitzen eine unbegrenzte Replikationsfähigkeit mit konstanter Telomerlänge trotz vieler Zellteilungen. Sie müssen demnach einen Mechanismus entwickelt haben, der den Verlust der Telomerrepeats durch die Replikation kompensiert.

Maligne Tumorzellen sind genetisch veränderte Zellen, die bestimmte charakteristische Wachstumseigenschaften aufweisen, durch die sie sich von normalen Zellen unterscheiden. Sie wachsen gewebeinfiltrierend, zellverdrängend durch den Verlust von Zell-Zell-

Kontaktinhibition und proliferieren unkontrolliert. Weiterhin besitzt ein Tumor die Fähigkeit zur Metastasierung. *In vitro*-Kriterien für maligne Zellen sind das substratunabhängige (zum Beispiel auf Softagar oder Methylzellulose), das serumunabhängige und das mehrschichtige Wachstum durch die bereits erwähnte Kontaktinhibition. (FRANKS & TEICH 1991). Auf dem Weg zur malignen Transformation einer Zelle finden eine Reihe von genetischen Veränderungen statt, wie zum Beispiel die Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen oder die Aktivierung von Onkogenen (LAND et al. 1983). Ein wichtiger Schritt stellt dabei auch die Immortalisierung dar, durch die die Tumorzellen die Fähigkeit zu ungebremstem Wachstum erhalten (HAHN et al. I 1999). Unendlich viele Zellteilungen müßten unter Berücksichtigung des Endreplikationsproblems zu großen Verlusten an Telomersequenzen führen. Tumorzellen besitzen aber konstante Längen von Telomeren, die sich nicht verkürzen, sondern manchmal sogar an Länge zunehmen können (KIM et al. 1994, HAHN et al. I 1999). Also müssen auch sie einen Lösungsweg für die Neusynthese der Telomere gefunden haben.

Das Enzym *Telomerase* kann Telomerrepeats ATP-unabhängig in artspezifischer Basenabfolge *de novo* an vorhandene Telomersequenzen polymerisieren und so der ständigen Verkürzung der Chromosomenendstücke entgegenwirken (GREIDER & BLACKBURN 1985).

1.2 Telomerase

1.2.1 Vorkommen der Telomerase beim Menschen

Telomerase Aktivität hat man bis heute in 90% aller humanen malignen Tumoren finden können, während sie in den die Tumoren direkt benachbarten normalen Zellen fehlt (KIM et al. 1994, SHAY & BACCHETTI 1997).

Bei normalen Geweben kann man Telomeraseaktivität in allen Stammzellen, Keimzellen sowie in fast allen embryonischen somatischen Zellen nachweisen, wobei die Aktivität mit zunehmender Reifung und Differenzierung der Zellen stark abnimmt und schließlich erlischt. (WRIGHT et al. 1996). In wenigen normalen erneuerbaren Geweben kann man ebenfalls Telomeraseaktivität nachweisen, hier allerdings in nur sehr geringem Maße im Gegensatz zu Stammzellen und Tumorgeweben. So weisen zum Beispiel periphere Monozyten im Blut eine sehr geringe Telomeraseaktivität auf. Diese beträgt jedoch nur 1-2% der Aktivität von malignen Zellen (HIYAMA, K.I. et al. 1995, COUNTER et al. 1995). Ruhende T-Zellen exprimieren sehr geringe Mengen an Telomerase, die aber bei Aktivierung zunimmt (BUCHKOVICH & GREIDER 1996, WENG et al. 1996). Der in Experimenten gelungene Nachweis sehr geringer Spiegel an Telomeraseaktivität in normaler Mukosa des Gastrointestinaltraktes (10-100fach niedriger als in kanzeröser Mukosa) wird allerdings auf Aktivität von akzidentiell mituntersuchten Stammzellen zurückgeführt (HIYAMA E. et al. 1996, BRESLOW et al. 1997).

1.2.2 Struktur und Funktion humaner Telomerase

Telomerase ist ein Ribonucleoproteinkomplex bestehend aus einer RNA-Untereinheit und weiteren Proteinuntereinheiten, von denen hTERT und hTAP1 die am besten erforschten darstellen (GREIDER & BLACKBURN 1985, MORIN 1989, GREIDER & BLACKBURN 1989, SHIPPEN-LENTZ & BLACKBURN 1990). Es besitzt enzymatische Aktivität gleich einer reversen Transkriptase. Bei *in vitro* Experimenten mit einem Säugetier- und Pflanzen-Transkriptions-/Translationssystem konnte durch die Cosynthese der RNA-Untereinheit und der enzymatischen Untereinheit Telomeraseaktivität erzeugt werden, die der Aktivität des nativen Enzyms entspricht. Dadurch wurde gezeigt, daß hTR und hTERT die

Minimalkomponenten von aktiver Telomerase darstellen (WEINRICH et al. 1997, BEATTIE et al. 1998, GREENBERG et al. 1998).

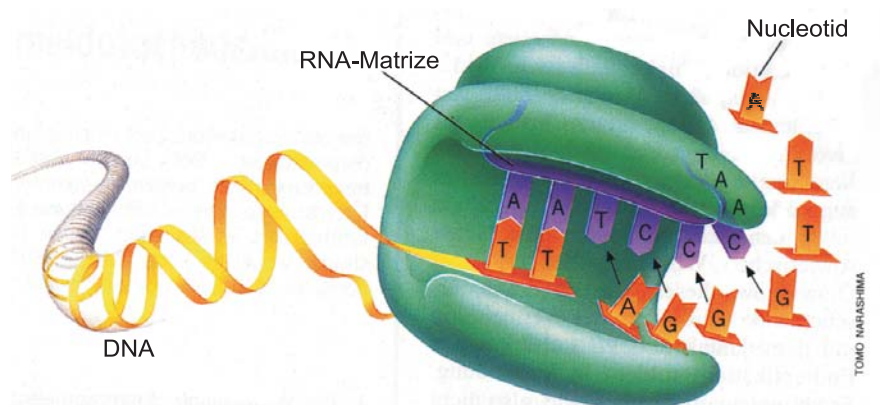


Abbildung 1-3: Telomerase

Gezeigt ist eine vereinfachte Darstellung des Multienzymkomplexes der Telomerase bestehend aus einer RNA-Untereinheit und verschiedenen Proteinuntereinheiten.

nach: Tomo Narashima, Scientific American, dt. Ausgabe, Digest »Altern, Krebs und Gene«, 2/1998

1.2.2.1 Die RNA-Untereinheit

Die RNA menschlicher Telomerase (hTR) besteht aus 445 Nucleotiden, von denen eine Sequenz von 11 Nucleotiden so in den Proteinkomplex eingebunden sind, daß sie Templatefunktion bei der Polymerisierung der charakteristischen [TTAGGG]-Telomerwiederholungen übernehmen. Die Basenabfolge dieses RNA-Templates lautet dabei 5'-[CUAACCCUAAC]-3' (FENG et al. 1995). Die Aufklärung der Sekundärstruktur der Säugetier-Telomerase-RNA und der Vergleich mit der Telomerase-RNA verschiedener Spezies zeigte, daß Telomerase ähnlich wie die Telomere selbst ein hochkonserviertes Enzym zu sein scheint (Chen et al. 2000). Das Vorhandensein der RNA-Untereinheit ist essentiell für die Aktivität von Telomerase und die Proliferationskapazität von Stammzellen und Tumorzellen (NIIDA et al. 1998, LEE et al. 1998, KONDO et al. 1998), obgleich hTR nicht nur in immortalisierten Zellen sondern auch in normalen Zellen ohne Telomeraseaktivität exprimiert wird. Gleichzeitig ist auch die Expressionsrate nicht mit der Quantität der Telomeraseaktivität vergleichbar und hat somit keine Aussagekraft über diese (FENG et al. 1995, AVILION et al. 1996). Der RNA-Anteil dient aber nicht nur als Vorlage bei der reversen Transkription, sondern er beeinflusst die Enzymaktivität direkt durch Interaktion mit strukturellen Komponenten und Nukleotiden der DNA und der anderen Telomerase-Proteinuntereinheiten (ROY et al. 1998). Dabei konnte gezeigt werden, daß für die Aktivierung von Telomerase zwei unterschiedliche und voneinander unabhängige hTERT-Bindungsstellen innerhalb der hTR von entscheidender Bedeutung sind. Bei einer dieser

Bindungsstellen handelt es sich um eine von vier evolutionär erhaltenen Domänen - die sogenannte CR4-CR5 Domäne der hTR (MITCHELL & COLLINS 2000, BACHAND & AUTEXIER 2001). Zusätzlich scheint aber nicht nur die Sequenz selbst für die Bindung der Proteinanteile und damit die Aktivität der Telomerase wichtig zu sein, sondern auch die Topologie bestimmter Teile der hTR in Form eines sogenannten Pseudoknots (GILLEY & BLACKBURN 1999). Auch schreibt man der nicht als Template dienenden RNA-Domäne eine Regulatorfunktion der Gesamtzymstruktur, -funktion und -aktivität zu, die vermutlich durch eine noch nicht ganz verstandene Interaktion zwischen den Proteinanteilen der Telomerase stattfindet (BHATTACHARYYA & BLACKBURN 1997, BACHAND ET AL. 2001).

1.2.2.2 Die Proteinuntereinheiten hTERT und hTAP1

Das Protein hTERT stellt die katalytische Untereinheit der Telomerase dar (NAKAMURA et al. 1997, MEYERSON et al. 1997, HARRINGTON I et al. 1997, KILIAN et al. 1997, NAKAYAMA et al. 1998). Transfektionsversuche mit normalen diploiden humanen Zellen haben gezeigt, daß hTERT der limitierende Faktor für Telomeraseaktivität ist (WEINRICH et al. 1997). Das Polypeptid, bestehend aus 1123 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 120 kDa, weist zu 46-49% Sequenzhomologien zu Telomerasen anderer Spezies auf. Es besitzt bestimmte Anteile, von denen einige bei allen bisher untersuchten Telomerasen und andere bei verschiedenen anderen Reversen Transkriptasen gefunden wurden. Mutationen in diesen Reverse-Transkriptase-Regionen bewirkt die Aufhebung von Telomeraseaktivität (NAKAYAMA et al. 1998, WEINRICH et al. 1997).

hTERT alleine besitzt *in vitro* die Fähigkeit, hTR ohne zusätzliche Proteine zu binden und so revers zu transkribieren (WEINRICH et al. 1997, BEATTIE et al. 1998, GREENBERG et al. 1998). Gleichzeitig existieren von hTERT-Messenger-RNA mehrere verschiedene Splicingvarianten (KILIAN et al. 1997, COLGIN & REDDEL 1999, WICK et al. 1999), auf deren Bedeutung in Kapitel 1.2.3.2. genauer eingegangen wird.

hTAP1 ist das bisher einzige identifizierte der humanen Telomerase assoziierte Protein. Es besteht aus 2627 Aminosäuren (HARRINGTON et al. II 1997), doch wurden bislang nur einige Domänen näher charakterisiert. Darunter befindet sich eine zum *Tetrahymena* telomeraseassoziierten Protein p80 homologe Domäne, von der man aus Beobachtungen mit *Tetrahymena* vermutet, daß sie die Fähigkeit zur Bindung der RNA-Untereinheit der Telomerase besitzt (HARRINGTON et al. II 1997). Weiterhin besitzt hTAP1 ein zentrales ATP/GTP bindendes Motiv, dessen Funktion nicht verstanden ist, und eine Domäne von WD-40-

Wiederholungen, von denen man weiß, daß sie Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Aufgrund dieser Kenntnisse und der Beobachtung, daß hTAP1 mit RNA- und katalytischer Untereinheit gleichzeitig interagiert (HARRINGTON et al. II 1997, HARRINGTON et al. I 1997, LI et al. 1998), vermutet man, daß das Protein eine Bindestruktur von Telomerase regulierenden Faktoren sein könnte. Außerdem glaubt man, es stehe mit der Koordination der Tertiär- und Quartärstruktur von Telomerase in Zusammenhang (LIU 1999). Genaue Erkenntnisse hierzu stehen aber bis dato aus.

Unter Berücksichtigung der Beobachtung, daß die Molekularmasse des Telomeraseholoenzyms in *Euplotes crassus* zwischen 280 kDa und 5000 kDa variiert (GREENE & SHIPPEN 1998) und der Tatsache, daß bei Proteinanalysen von humanen Mammarkarzinomzellen einige neue Proteine mit Homologien zu reversen Transkriptasen gefunden wurden (LIU 1999, LI et al. 1998), scheint die Existenz weiterer zusätzlicher katalytischer Untereinheiten der Telomerase nicht unwahrscheinlich zu sein (LIU 1999).

Zusätzlich zu den bereits genannten telomeraseassoziierten Proteinen bestehen Kenntnisse über weiter derartige Proteine wie Dyskerin (MITCHELL et al. 1999), humanes Staufenprotein (LE et al. 2000), Chaparone-Proteine (HOLT et al. 1999) und hnRNP-Proteine (DALLAIRE et al. 2000, FORD et al. 2000, LABRANCHE et al. 1998). Die genaue Funktion dieser Proteine konnte bisher nur unzureichend geklärt werden.

1.2.2.3 Funktion der Telomerase

Die Funktionsweise, mit der Telomerase die Enden der Chromosomen verlängert, ist bis heute nur unvollständig verstanden. Man stellt sich den Syntheseablauf (siehe Abbildung 1-4) so vor, daß der Telomeraseenzymkomplex mit dem einsträngigen G-reichen 3'-Überhang an den Telomeren interagiert. Der telomerische Überhang dient dem Enzym als Primer, an den es Deoxynucleosidtriphosphate (dNTP) polymerisiert. Die RNA der Telomerase hybridisiert mit ihrem eigenen 3'-Ende ihrer telomerkomplementären Sequenz mit den letzten Nucleotiden der telomerischen DNA und richtet sich so entlang dieser aus. Die RNA übernimmt die Rolle des komplementären Templates, an das das Enzym nun ein Nucleotid nach dem anderen entsprechend der Sequenz des RNA-Templates revers transkribiert. Bei dieser ATP-unabhängigen Elongation ergibt sich daraus die Basenabfolge der neu synthetisierten DNA-Stücke, die der telomerischen 6-Basen Repeats entspricht: 5'-[TTAGGG]-3' (GREIDER & BLACKBURN 1989, MORIN 1989, SHIPPEN-LENTZ & BLACKBURN 1990). Erst wenn das RNA-Template vollständig mit komplementären Basen ergänzt ist, transloziert die Telomerase entlang des neuen DNA-Abschnittes, hybridisiert wie zuvor mit dessen letzten

Basen, um den Prozess von Neuem in Gang zu setzten. Iterativ werden so die Enden der Chromosomen elongiert. Das C-reiche komplementäre DNA Strangende wird durch eine Primase-Polymerase in 5'-3'-Richtung verlängert (SHAMPAY et al. 1984, ZAHLER & PRESCOTT 1989).

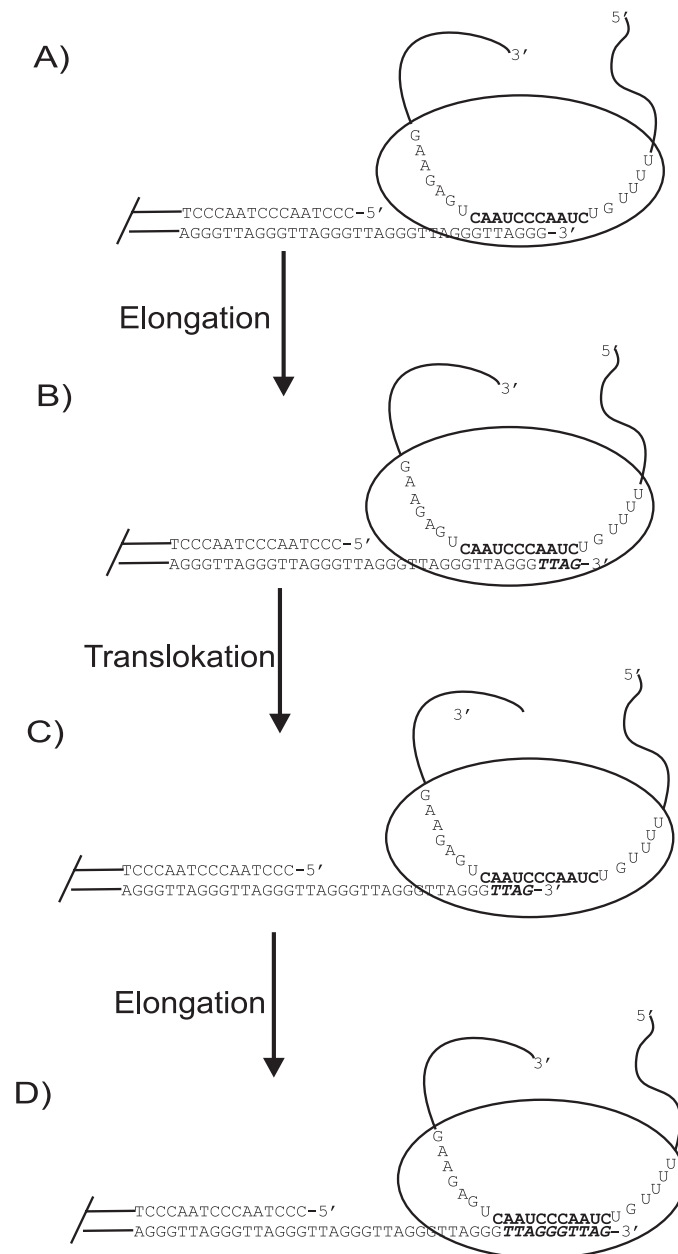


Abbildung 1-4: Elongation der Telomere durch Telomerase

A) Der 3'-Überhang des Telomers hybridisiert mit der RNA Templatesequenz der Telomerase.

B) Mit Hilfe der RNA als Template verlängert der Enzymkomplex die Telomere durch reverse Transkription.

C) Die Telomerase transloziert an das neue Ende des Chromosoms, um den Vorgang erneut zu beginnen (D). Der C-reiche Strang wird durch eine Primase-Polymerase elongiert.

nach: GREIDER & BLACKBURN 1989

Jüngste *in vitro* Experimente deuten darauf hin, daß der Ribonucleinproteinkomplex der humanen Telomerase ein Dimer bildet, welches zwei RNA-Moleküle enthält. Es konnte gleichzeitig gezeigt werden, daß die Mutation eines dieser beiden RNA-Stränge zur überproportionalen Abnahme der Telomeraseaktivität führt. Somit muss angenommen werden, daß eine Interaktion zwischen den beiden RNA-Molekülen bei der Telomereelongation stattfindet (WENZ et al. 2001). Allerdings konnte der detaillierte Ablauf der Bildung neuer Telomersequenzen durch das Telomersedimer und der eigentliche Zweck der Dimerisierung noch nicht geklärt werden. Die Dimersisierung konnte auch noch nicht *in vivo* nachgewiesen werden.

Die katalytische Aktivität und die Prozessivität des Enzyms benötigen optimale Bedingungen hinsichtlich Reaktionstemperatur, Ionenmilieu und Enzym-Substrat Interaktion. Während sich die katalytische Aktivität bei Veränderung bestimmter Reaktionsparameter steigern läßt, verringert sich dabei gleichzeitig die Prozessivität. Dies betrifft die Erhöhung der Temperatur auf über 37°C sowie die Erhöhung der Kation- und Substratkonzentration (telomerische DNA) (SUN et al. 1999). Die Zugabe synthetischer [TTAGGG]-Oligodeoxynucleotide sowie der Inhibitoren der Reversen Transkriptase Azidothymidin oder Carbovir zu Zellen hemmt deren Telomeraseaktivität und induziert Apoptose (MORIN 1989, ZAHLER et al. 1991, STRAHL & BLACKBURN 1996, YEGOROV et al. 1996).

Über die beschriebende Funktionsweise hinaus hat Telomerase einen telomerstabilisierenden und telomerverlängernden Effekt auf Zellen. Die Aktivierung des Enzyms ermöglicht ihnen die unbegrenzte Proliferation, verhindert die Alterung dieser Zellen und führt zur Immortalisierung (KIYONO et al. 1998, BODNAR et al. 1998). Trotzdem reicht eine Immortalisierung von Zellen durch Telomerase *per se* nicht aus, um bei diesen Zellen auch eine maligne Transformation zu bewirken (MORALES et al. 1999). Hierzu sind zusätzliche genetische Veränderungen, wie zum Beispiel die Ausschaltung der Tumorsuppressorgene *RB* und *p53* und die Aktivierung des Onkogens *ras*, unerlässlich (HAHN et al. 1999 II). Obwohl Telomeraseaktivität in 90 % der untersuchten menschlichen malignen Tumoren nachgewiesen werden konnte und man aus diesem Grund die Aktivierung von Telomerase stark mit Malignität assoziiert, so muß doch bedacht werden, daß Telomerase weder ein Onkogen ist noch Krebs hervorruft (MORALES et al. 1999). Allerdings kann das Wachstum von Tumorzellen durch Inhibition von Telomerase aufgehalten werden, und es kann bei ihnen sogar Apoptose induziert werden. Die Aktivität von Telomerase ist also nicht nur für die Proliferationskapazität bei Stammzellen und für die korrekte Spermatogenese (LEE et al. 1998), sondern auch für das Überleben von Tumorzellen von großer Bedeutung (HAHN et al. 1999 I, HERBERT et al. 1999). Gleichzeitig steht aber auch die Differenzierung von

Zellen mit dem Verlust von Telomeraseaktivität in Zusammenhang. Bei der Hemmung der Aktivität dieses Enzyms in malignen Gliomzellen konnte zum einen Apoptose, zum anderen aber gleichzeitig auch eine Zelldifferenzierung induziert werden (KONDO et al. 1998).

Weiterhin wurde die Verwendung von hTERT zu therapeutischen Zwecken in Erwägung gezogen. Im Rahmen zum Beispiel der autologen Stammzelltransplantation bei der Behandlung hämatologischer Erkrankungen überleben unter den heutigen Standardkulturbedingungen die separierten Stammzellen nur eine begrenzte Zeit. Durch Transfektion von hTERT könnte diese Überlebenszeit verlängert werden. Bei Untersuchungen mit humanen Mammaepithelzellen, die mit hTERT transfiziert und unter normalen Kulturverhältnissen gehalten wurden, zeigte sich jedoch, daß es zu einer Aktivierung und deutlichen Überexpression des Onkogens *c-myc* kam (WANG et al. 2000). Eine therapeutische Anwendung von hTERT sollte also nur zurückhaltend vonstatten gehen.

1.2.3 Die molekulare Regulation der Telomeraseaktivität

Der genaue molekulare Mechanismus, der zur Aktivierung von Telomerase und zur Verhinderung der replikativen Seneszenz führt, wurde bis dato nur ansatzweise aufgedeckt. Wie bereits beschrieben, wird in den meisten normalen Zellen des Menschen keine Telomeraseaktivität jedoch hingegen in circa 90% der Tumoren und immortalisierten Zelllinien gefunden. Ruhende Lymphozyten zeigen niedrige Aktivitätsraten der Telomerase, jedoch steigt diese bei B-Lymphozyten durch Stimulation des B-Zell-Antigenrezeptoren auf der Zellmembran durch Anti-IgM Antikörper und Anti-CD40 monoklonale Antikörper (IGARASHI & SAKAGUCHI 1997, HU et al. 1997) an. Bei T-Lymphozyten konnte eine Induktion der Telomeraseaktivität über die Stimulierung von CD3 (sowohl mit als auch ohne die Kostimulation von CD28) oder über die Stimulierung durch Phorbol Myristat Acetat (PMA)-Ionomycin erreicht werden (WENG et al. 1996). Dabei bewirken Signale, die zu einer Kostimulation des T-Zellrezeptors und CD28-B7 führen, *in vitro* eine optimale antigenspezifische Telomeraseinduktion (HATHCOCK et al. 1998). Ebenso läßt sich beim Menschen Telomeraseaktivität in normalen Hautzellen durch starke Sonneneinstrahlung (UEDA et al. 1997), in hämatopoetischen Zellen durch γ -Strahlung (LETEURTRE et al. 1997) und in Tumorzelllinien durch Röntgenstrahlung (HYEON JOO et al. 1998) induzieren. Umgekehrt aber kann *in vitro* Telomeraseaktivität in Tumorzelllinien auch unterdrückt werden, wenn diese künstlich zum Ausdifferenzieren gezwungen werden und deshalb den Zellzyklus verlassen (SHARMA et al. 1996, HOLT et al. 1996, BESTILNY et al. 1996, XU et al. 1996, SAVOYSKY et al. 1996) oder wenn sie mit dem GN-RH Antagonisten MZ-5-156 behandelt werden (KIARIS & SCHALLY 1999). Eine Unterdrückung von Telomeraseaktivität ist auch schon

im Tiermodell *in vivo* gelungen, indem Nacktmäuse mit U-87MG humanen Glioblastomzell-Xenografts mit dem bereits erwähnten GH-RH Antagonisten MZ-5-156 therapiert wurden (KIARIS & SCHALLY 1999). All diese Ergebnisse sind Indizien dafür, daß Telomerase reversibel reguliert zu sein scheint.

1.2.3.1 Regulierung der Genexpression

Der entscheidende Schritt bei der Aktivierung der Telomerase auf der Ebene der Genexpression scheint die Regulierung der Transkription von hTERT, der enzymatischen Untereinheit, zu sein. Dies ergibt sich aus der Tatsache, daß die anderen bekannten Untereinheiten hTR und hTAP1 in normalen menschlichen Geweben ubiquitär exprimiert werden (HARRINGTON et al. 1997, NAKAYAMA et al. 1997, FENG et al. 1995, AVILION et al. 1996, BLASCO et al. 1995, KYO et al. 1999, SUMIDA et al. 1999), während die Expression von hTERT in den meisten normalen Geweben nach der Geburt unterdrückt wird (NAKAMURA et al. 1997, MEYERSON et al. 1997, ULANER et al. 1998, KOLQUIST et al. 1998) aber in Telomerase-positiven Tumoren und Zelllinien wieder nachweisbar ist (NAKAMURA et al. 1997, MEYERSON et al. 1997, KYO et al. 1999, SUMIDA et al. 1999, TAKAKURA et al. 1999). Weiterhin bewirkt bereits die bloße ektope Expression von hTERT in telomerasenegativen Zellen die Herstellung der Telomeraseaktivität (NAKAYAMA et al. 1998, WEINRICH et al. 1997), die Verlängerung der Telomere (BODNAR et al. 1998, VAZIRI & BENCHIMOL 1998) und der Lebenszeit dieser Zellen (BODNAR et al. 1998, VAZIRI & BENCHIMOL 1998, COUNTER et al. 1998). Man geht davon aus, daß die in normalen Zellen nachweisbaren Untereinheiten hTR und hTAP1 einen inaktiven Telomerasekomplex bilden, der erst dann in seine aktive Form übergeht, sobald auch hTERT exprimiert wird und den Gesamtkomplex vervollständigt. Untersuchungen des hTERT Promotors haben gezeigt, daß dieser während der Zellimmortalisierung aktiviert wird und mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren besitzt (WICK et al. 1999, CONG et al. 1999). Mehrfach wurde gezeigt, daß *c-myc* - ein Protoonkogen mit Transkriptionsaktivität - Telomerase aktiviert (TAKAKURA et al. 1999, WANG et al. 1998, WU et al. 1999, HORIKAWA et al. 1999) und umgekehrt die Hemmung der *c-Myc* Translation Telomeraseaktivität verhindert (FUJIMOTO & TAKAHASI 1997). Weiterhin konnte aufgedeckt werden, daß der hTERT Promotor zwischen CpG-Inseln liegt. Es ist bekannt, daß die Methylierung von CpG-Inseln eine wichtige Rolle bei der Regulierung der normalen Entwicklung, Differenzierung, Seneszenz und Tumorigenese spielen (LAIRD & JAENISCH 1996, MERLO et al. 1995, GONZALEZ-ZULUETA et al. 1995, DENG et al. 1999). Also vermutet man auch bei der Expressionregulierung der enzymatischen

Telomeraseuntereinheit, daß die Methylierung der promotornahen CpG-Inseln von Bedeutung ist (Wick et al. 1999, Devreux et al. 1999).

Am hTERT Promotor beeinflußt aber auch ein hemmender Faktor die Expression der katalytischen Untereinheit. Durch diesen Faktor wird Telomeraseaktivität herunterreguliert, wodurch die Telomere zunehmend verkürzen und es in der betroffenen Zelle zum Wachstumsstillstand kommt. Das zugehörige Gen des vermeintlichen hTERT Suppressors wurde auf Chromosom 3 gefunden und seine Position näher eingegrenzt (3p14.2-p21.3), ohne jedoch genauer identifiziert worden zu sein (OHMURA et al. 1995, HORIKAWA et al. 1998, TANAKA et al. 1998, CUTHBERT et al. 1999, SHAY 1999).

Durch bisher unverstandene Mechanismen kann Telomeraseaktivität auch durch Überexpression des apoptosehemmenden Onkoproteins Bcl-2 (MANDAL & KUMAR 1997, FU et al. 1999), durch das p53 hemmende humane Papillomavirus Typ 16 E6 Protein (KLINGELHUTZ et al. 1996, KIYONO et al. 1998) und durch die Onkogene SV40 und v-*K_r*-ras (BURGER et al. 1998, RHIM et al. 1998) hochreguliert werden. Eine Herunterregulierung der Enzymaktivität wird über die den Zellzyklus beeinflussenden Proteine Rb und p21^{WAF1} vermittelt (KALLASSY et al. 1998, TERASAKI et al. 1999), wobei dies wiederum bei letzterem durch die Herunterregulierung des RNA-Anteils hTR geschieht (KALLASSY et al. 1998). Die Details der Beeinflussung der Telomeraseaktivität durch Rb sind hingegen nicht bekannt.

1.2.3.2 Regulierung durch Splicingvarianten

Bei der Untersuchung der mRNA von hTERT hat man verschiedene alternative Splicingvarianten aufdecken können (KILIAN et al. 1997, COLGIN & REDDEL 1999, WICK et al. 1999). die jeweils mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten einhergehen. Sie werden in unterschiedlichen Entwicklungsstufen bestimmter Organe und Gewebe gefunden, so daß man die gemessenen Unterschiede in der Aktivität von Telomerase in Zellen während der Organentwicklung auf diese Splicingvarianten zurückführt (ULANER et al. 1998).

1.2.3.3 Postrtranslationale Regulierung

Die Proteinuntereinheit hTAP1 scheint eine regulierende Aufgabe zu übernehmen, indem es hTR, hTERT, telomerische DNA und andere potentielle Regulationsfaktoren rekrutiert (LIU 1999). Während hTAP1 Bestandteil des aktiven Telomerasekomplexes ist und

offensichtlich selbst Telomeraseaktivität nicht beeinträchtigt, existiert ein Peptid am aminoterminalen Ende von hTAP1, das Telomeraseaktivität *in vitro* hemmt. Es trägt auch den Namen *Telomerase Inhibierendes Polypeptid 1 (TEIPP1)*. Wie verschiedene Untersuchungen zeigten, ist hTAP1 ein Oligomer, dessen Bestandteil TEIPP1 ist (LI et al. 1999). Der genaue Inhibitionsvorgang ist allerdings noch nicht bekannt.

Das bereits beschriebene telomerassoziierte Protein TRF1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Telomeraseaktivität. Als Homodimer bindet es an die doppelsträngige Telomer-DNA und ist - wie bereits beschrieben - bei der Ausbildung der Telomerloops maßgeblich beteiligt. TRF1 inhibiert über einen noch unbekannten Mechanismus die Aktivität von Telomerase. Überexpression von TRF1 in Telomerase-positiven Tumorzellen führte zu allmählicher Telomerverkürzung (VAN STEENSEL & DE LANGE 1997). TRF1 kann aber nur bei ausreichend langen Chromosomenendstücken stabil gebunden bleiben. Ab einer bestimmten kritischen Länge ist diese Bindung nicht mehr möglich. Als Konsequenz wird in der Zelle Telomerase aktiviert. Neben TRF1 hat man noch zwei weitere Komponenten entdeckt, die eine Wirkung auf Telomeraseaktivität besitzen. Hierzu gehört zum einen die *Tankyrase*, ein Enzym mit einer katalytischen Domäne homolog zur Poly(ADP-Ribose)Polymerase. Es kann TRF1 und sich selbst ribosylieren, wodurch es zur Ablösung von TRF1 und Tankyrase von den Telomeren kommt. Durch Wegfall des telomerasehemmenden Proteins TRF1 bewirkt Tankyrase eine positive Regulierung der Telomeraseaktivität (SMITH et al. 1998, PENNISI 1998). Weiterhin konnte ein neuer Faktor identifiziert werden (TIN2), der zusammen mit TRF1 Einfluss auf Telomeraseaktivität hat. TRF1 und TIN2 werden konstitutiv exprimiert. TRF1 bindet TIN2 am Telomer. TIN2 beeinflusst nun umgekehrt TRF1 auf unbekannte Weise und führt darüber ebenfalls zu einer negativen Regulierung von Telomeraseaktivität. Obwohl nicht genau bekannt ist, wie TIN2 die Länge der Telomere beeinflusst, so weiß man doch, daß es weder die Aktivität von Telomerase *in vitro* hemmt noch direkt mit der katalytischen Untereinheit der Telomerase interagiert (KIM et al. 1999). Es wird vermutet, daß es eventuell die t-Loops der Telomere stabilisiert und so den einsträngigen 3'-Überhang der Telomerase nicht zugänglich macht (SHAY 1999).

Weiterhin ist bekannt, daß das Tumorsuppressorprotein p53 durch Bindung an hTAP1 Telomeraseaktivität *in vitro* inhibiert (LI et al. 1999, LIU 1999). So hat die Transfektion des mutierten *p53*-Gens in humane Brustdrüsenepithelzellen zu einer Immortalisierung der Zellen und zur Reaktivierung von Telomerase geführt (GOLLAHON & SHAY 1996). Bei Experimenten mit sonnenexponierter Haut konnten bei Zellen mit UV-spezifischen *p53*-Mutationen zu 100% auch Telomeraseaktivität beobachtet werden. Umgekehrt aber besaßen nur circa die Hälfte aller Telomerase-positiven Hautzellen auch eine *p53*-Mutation, so daß

man daraus schlußfolgert, daß bei UV-exponierten Hautzellen die Aktivierung von Telomerase vor der Mutation von *p53* stattfindet (UEDA et al. 1997).

Die Phosphorylierung ist ein wichtiger posttranslationaler Mechanismus zur Aktivitätsregulierung von Proteinen. Auch bei dem Telomeraseenzymkomplex kann so die Aktivität beeinflußt werden. So hat man entdeckt, daß sowohl hTERT als auch hTAP1 Phosphoproteine sind, die über Phosphorylierung durch Proteinkinase C α (PKC α) erst aktiviert werden (LI et al. 1998). Dieser Schritt scheint auch maßgebend für die funktionell korrekte Zusammenlagerung der Unterkomponenten der Telomerase zu sein. Eine Dephosphorylierung durch Proteinphosphatase 2A (PP2A) hemmt wiederum die Telomeraseaktivität (LI et al. 1997). Die Reaktivierung durch wiederholte Phosphorylierung ist nun wieder durch PKC α aber auch über die Proteinkinase C Isoformen PKC δ , PKC ϵ und PKC ζ möglich. Noch nicht geklärt ist, ob dabei die Proteinkinase C in verschiedenen Zelltypen bestimmte isoformspezifische Regulationsaufgaben übernimmt (LI et al. 1998, LIU 1999).

Neben PKC phosphoryliert auch Proteinkinase B (PKB oder Akt) die enzymatische Untereinheit hTERT und stimuliert so Telomeraseaktivität. So vermutet man, daß der PI3-Signalweg, der durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird, unter anderem auch zur Aktivierung von Telomerase führt und so Einfluß auf das Wachstum maligner Zellen hat (KANG et al. 1999).

1.2.4 Alternative Mechanismen zur Telomerlängenstabilisierung

In einigen humanen Tumorzelllinien und immortalisierten Zellen sind trotz fehlender Telomeraseaktivität stark verlängerte Telomere beobachtet worden (BRYAN et al. 1995, BRYAN et al. 1997). Man muß also gleichzeitig von der Existenz eines alternativen Mechanismus zur Stabilisierung der Telomerlängen ausgehen. Allerdings wurde dieser als ALT bezeichnete Prozess (*»Alternative Lengthening of Telomeres«*) häufiger in Zellen fibroblastischen als epithelialen Ursprungs entdeckt und hatte eine höhere Inzidenz in *in vitro* immortalisierten Zelllinien als in aus Patiententumoren gewonnenen Zelllinien. Außerdem besitzt die Großzahl der auf ALT untersuchten telomerasenegativen Tumoren sehr kurze Telomere, so daß in ihnen offensichtlich keine ALT-Aktivität vorherrscht. Trotzdem läßt sich zusammenfassend sagen, daß immortalisierte Zellen entweder Telomeraseaktivität

aufweisen oder aber ALT besitzen müssen, um ihre langen Telomere zu konservieren (BRYAN et al. I 1997).

1.3 Nachweis von Telomeraseaktivität

1.3.1 Telomerlänge

Entgegen der zunächst gängigen Annahme der Korrelation zwischen Telomerlänge und Telomeraseaktivität hat sich gezeigt, daß dies nicht der Fall ist (KIM et al. 1994). Eine vorrübergehende Ungleichheit zwischen Geschwindigkeit der Telomerverkürzung und Aktivitätsrate der Telomerase kann für diese Beobachtung verantwortlich sein (TAKAGI et al. 1999). Gleichzeitig ist bekannt, daß in einigen menschlichen Tumoren und Zelllinien eine Telomerverlängerung ohne Telomeraseaktivität stattfindet. Es existiert hier ein alternativer Mechanismus der Telomerverlängerung (BRYAN et al. 1995, BRYAN et al. I 1997, BRYAN et al. II 1997), so daß die Telomerlänge kein Indikator für die Aktivität der Telomerase ist.

1.3.2 Expressionsbestimmung von hTR und hTERT

Minimalkomponenten zur Herstellung der Telomeraseaktivität sind hTR und hTERT (WEINRICH et al. 1997, BEATTIE et al. 1998, GREENBERG et al. 1998). Deshalb erhoffte man sich, über Expressionsbestimmungen dieser beiden Bestandteile die Aktivität von Telomerase über RT-PCR bzw. Northern Blotting bestimmen zu können. Es hat sich aber gezeigt, daß die Expressionsrate von hTR nicht mit der Telomeraseaktivität in normalen, immortalisierten oder malignen Zellen korreliert (AVILION et al. 1996) hTR wird ubiquitär exprimiert, so daß die Bestimmung der hTR-Expression keine Aussage über die Telomeraseaktivität macht (HARRINGTON et al. I 1997, FENG et al. 1995, AVILION et al. 1996). So erschien die Untersuchung der Expression von hTERT sinnvoll. Wie bereits beschrieben kann Telomeraseaktivität auch nur bei gleichzeitiger Expression von hTERT vorliegen (WEINRICH et al. 1997, BEATTIE et al. 1998, GREENBERG et al. 1998). Aufgrund der vielfältigen posttranskriptionalen und posttranslationalen Regulationsmechanismen (Splicingvarianten, Phosphorylierungszustand, hemmendes Peptid bei stattfindender hTERT Expression, Zerstörung der Telomeraseaktivität durch RNAsen) kann aber nicht automatisch von einer

nachgewiesenen hTERT Expression auf das Vorliegen von Telomeraseaktivität geschlossen werden (ULANER et al. 1998).

1.3.3 Messung der Telomeraseaktivität

Die Aktivität von Telomerase kann *in vitro* durch einen Primerextensionsassay direkt gemessen werden, bei dem die Telomerase telomerische Sequenzen auf Oligonucleotidprimer synthetisiert, die wiederum in einer anschließenden PCR amplifiziert und danach visualisiert werden können (GREIDER & BLACKBURN 1985, GREIDER & BLACKBURN 1989). Diese Versuchsanordnung wurde durch Etablierung des TRAP-Assays (*»Telomeric Repeat Amplification Protocol«*) weiter in Sensitivität, Geschwindigkeit und Effektivität verbessert (KIM et al. 1994). Durch diesen Assay ist es gelungen, in Zellextrakten aus einer Anzahl von nur bis zu 100 immortalisierten Zellen Telomeraseaktivität in einem einzigen Reaktionsgefäß nachzuweisen. Die Produkte des TRAP-Assays können unter Zuhilfenahme von radioaktiven oder nicht-radioaktiven Nachweismethoden sichtbar gemacht werden. So visualisiert man entweder über Autoradiographie, durch Exposition auf einem Phosphorimager oder über Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer (OHYASHIKI et al. I 1996, OHYASHIKI et al. II 1996). Bei dem TRAP-Assay wird die Telomeraseaktivität in einem Proteinextrakt gemessen. Es besteht aber alternativ auch die Möglichkeit der Durchführung eines *in situ*-TRAP-Assays (OHYASHIKI et al. 1997). Mit dieser Methode kann die Enzymaktivität auf zellulärer Ebene bestimmt werden und so in bestimmten Zellen explizit lokalisiert werden.

Bei der Durchführung eines TRAP-Assays ergeben sich diverse Probleme, die die Validität und Sensitivität des Nachweises der Telomeraseaktivität maßgebend beeinträchtigen können. Problematisch ist dabei unter anderem die PCR, die Bestandteil eines TRAP-Assays ist. So wurde dabei das Problem der Primerdimerisierung mit nachfolgender gestaffelter Primeranlagerung (*»Staggered Annealing«*, siehe Kapitel 4.1.4) beschrieben (KIM et al. 1994, KRUPP et al. 1997). Das hierdurch entstandene Produkt sieht den regulären TRAP-Banden im Abstand von 6 bp (im Folgenden *»TRAP-Leiter«* genannt) sehr ähnlich. Die Aufdeckung dieser *»Leiter«* als PCR-Artefakt gelingt durch einen genauen Vergleich mit den Banden der Positivkontrolle, die eine andere Größe besitzen. Durch die Artefaktbildung kommt es zu

falsch-positiven Ergebnissen (KRUPP et al. 1997), wodurch Validität und Sensitivität negativ beeinflußt werden.

Durch Zugabe eines internen Standards kann die Telomeraseaktivität auch semiquantifiziert werden (KIM & WU 1997). Die Messung von Telomeraseaktivität ist ebenfalls über einen ELISA möglich (*Boehringer Mannheim*[®]).

Die Anwendung dieser Meßmethoden ist anhand vieler verschiedener Materialien mit dem Schwerpunkt auf reine Tumorgewebe erprobt. Von großem Interesse ist aber die Messung von Telomeraseaktivität nicht nur in Tumorgewebe direkt sondern in Körperflüssigkeiten, die entweder über minimal- oder geringinvasive Methoden oder gleichzeitig während routinemäßig durchgeführten diagnostischen Maßnahmen klinisch gewonnen werden können. So gibt es einige Versuche, Telomeraseaktivität in den verschiedensten Punktions- und Zytologiematerialien wie unter anderem in Aszitesflüssigkeit (TANGKIJVANICH et al. 1999), Pankreassaft (SUEHARA et al. 1997), Urin, Blasenlavagen (YOSHIDA et al. II 1997, HEINE et al. 1998), Kolonlavagen (YOSHIDA et al. I 1997) und Bronchiallavagen (YAHATA et al. 1998) nachzuweisen.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Entdeckung neuer Tumormarker und die Entwicklung neuer Methoden zur Früherkennung von Krebs kann die Prognose der Tumorerkrankungen entscheidend beeinflussen. Die Marker müssen sich dabei valide und mittels sensitiver aber doch in der klinischen Routine durchführbare Methoden bestimmen lassen. Telomerase könnte dabei ein geeigneter Tumormarker sein. Von Vorteil für die routinemäßige Bestimmung von Telomerase ist eine patientenschonende Materialgewinnung, die relativ einfach und schnell durchzuführen ist. Dabei kommen sogenannte minimalinvasive Methoden immer mehr zur Anwendung. Gleichzeitig kann aber auch die Möglichkeit zur Materialgewinnung während routinemäßig durchgeführten Untersuchungen (wie zum Beispiel die Bronchoskopie) genutzt werden. Vor dem möglichen Einsatz von Telomerase als Screeningmarker müssen jedoch bestimmte Untersuchungen durchgeführt werden. Diverse auf minimalinvasive und andere Weise gewonnene Patientenmaterialien sollten auf ihre Eignung für die Bestimmung von Telomeraseaktivität geprüft werden. Zwar sind auf diesem Gebiet schon einige Vorarbeiten geleistet worden, doch wurde der Großteil dieser Ergebnisse mit Hilfe des TRAP-Assays von KIM et al. 1994 (im Folgenden »klassischer TRAP-Assay« genannt) erzielt. Aufgrund der bekannten Probleme dieser Methode hinsichtlich falsch-positiver Ergebnisse müssen die Methode und ihre Weiterentwicklungen optimiert werden, um bei einer möglicherweise zukünftigen Anwendung in der klinischen Routinediagnostik wirklich valide und gleichzeitig sensitive Messresultate zu erreichen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Klärung dieser Problemstellungen zu leisten.

Hierzu sollte der TRAP-Assay sensitiviert und optimiert werden, um ihn auf heterogene Zellgemische wie bronchoskopisch gewonnene Sputen und Lavagen sowie Pleuraergüsse, Aszites und Perikardergüsse mit sehr geringem malignen Zellanteil und häufig zytologisch nicht eindeutiger Diagnose anwenden zu können. Verschiedene Proben sollten auf ihre Eignung zur Untersuchung mit dem TRAP-Assay überprüft werden. Dabei mußten gleichzeitig bestimmte Probleme wie die Beseitigung von Erythrozyten und zähem Mucus aus den Proben gelöst werden. Außerdem sollte der Assay ohne zusätzliche Anschaffung kostenaufwendiger Detektionsgeräte etabliert und optimiert werden, um ihn auch in einem durchschnittlich ausgerüsteten Routine- oder Forschungslabor durchführen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle hier aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. Qualität bezogen.

ACC inject, 300 mg / Ampulle	Hexal AG, Holzkirchen
Acrylamid 30 %	Roth, Karlsruhe
AmpliWAX™ PCR Gem 100	Perkin Elmer, USA
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, USA
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma, USA
Count Off®	DuPont, USA
Radioactive Decontaminant Aerosol Spray Surface Cleaner	
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, USA
EDTA (Ethylendiamintetraacetische Säure)	Sigma, USA
EGTA (Ethylenglycol-bis-tetraacetische Säure)	Sigma, USA
Ethanol absolut	J.T. Baker, Holland
Ethanol 70 % vergällt	Apotheke des Klinikums der Philipps-Universität
FKS (Fetales Kälber Serum)	GibcoBRL, UK
Ficoll	Sigma, USA
Formamid	Bethesda Research Laboratories, USA
H ₂ O LiChrosolv®	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH (Pellets)	Merck, Darmstadt
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma, USA

TRIS-hydrochlorid (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid) $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$	Roth, Karlsruhe
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat)	Pharmacia Biotech, Schweden
Xylencyanol	Sigma, USA

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen ausschließlich von den folgenden Firmen: Gibco BRL (UK), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma (USA).

2.1.2 Enzyme, Fertigpuffer und Nucleinsäuren

Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim, Mannheim
Desoxynucleotide DNA-Polymerisationsmix (je 20 mM)	Pharmacia Biotech, Schweden
DNA-Längenstandards pUC Mix Marker, 8 pBR 322 DNA / <i>Bsu</i> RI Marker, 5	MBI-Fermentas MBI-Fermentas
CHAPS Lysis Puffer	Oncor Appligene, Frankreich
Nucleotide [$\gamma^{33}P$]-ATP (3000 Ci/mmol)	ICN Pharmaceuticals, USA
Oligonucleotide (Primer)	TIB Molbiol, Berlin
pNPP (p-Nitrophenylphosphat)	Vector Laboratories, USA
RNAse A (10 mg/ml)	Sigma, USA
RNAse Inhibitor (40 U/ μ l)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Medien für Zellkultur RPMI 1640 μ . 1 % L-Glutamin	GibcoBRL, UK
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
T ₄ -Polynucleotidkinase	Gibco BRL
T ₄ -Polynucleotidkinase Puffer 5 \times Exchange Puffer 5 \times Forward Puffer	Gibco BRL

2.1.3 Kits und Sonstiges

BioRad <i>DC</i> Protein Assay	BioRad, USA
QiaQuick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
TRAPEZE [®] Telomerase Detection Kit	Oncor Appligene, Frankreich

Die genaue Zusammensetzung der Kits und der darin enthaltenen Lösungen ist allein dem Hersteller bekannt.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen und Puffer werden - soweit nicht anders angegeben - mit entmineralisiertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert oder steril filtriert. Der pH-Wert wurde, wenn nicht anders erwähnt, mit 1 M Salzsäure oder 10 N Natronlauge eingestellt.

12 % Acrylamidlösung \times 1/2 TBE Ansatz für 500 ml	200 ml 30% Acrylamidlösung 170 ml H ₂ O 30 ml 5 \times TBE
Einfriermedium A	FKS 7,5% DMSO
1 \times Gelladepuffer I für PAA-Gel	95% Formamid 20mM EDTA, pH 7,6 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol
5 \times hypertone Lösung, pH 7,4	für 1 l Lösung: 80 g NaCl 2 g KCl 28,975 g Na ₂ HPO ₄ \cdot 12 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄
Lysis Puffer 1000 μ l	991,7 μ l CHAPS 5 μ l RNase Inhibitor (200 U) 3,3 μ l PMSF (Endkonzentration 1 mM)
Medien für Zelllinien	RPMI 1640 μ L-Glutamin 10 % FKS
Natriumbicarbonat - Lösung, pH 10,0	100 mM Natriumbicarbonat entspricht 0,84 g / 100 ml Wasser
1 M PBS, pH 6,8 (Phosphat gepufferte Salzlösung)	25,5 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ \cdot H ₂ O 24,5 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ \cdot 2 H ₂ O
RCLB , pH 7,6 (Red Cell Lysis Buffer)	10 mM Tris \cdot HCl 10 mM NaCl 5 mM MgCl ₂

1 × STE	100 mM NaCl 20 mM Tris • HCl, pH 7,5 10 mM EDTA
5 × TBE	0,5 M Tris • HCl 10 mM EDTA, pH 8,0 0,5 M Borsäure
10 × TRAP-Puffer Unbedingt mit DNA- und salzfreiem PCR-grade Wasser ansetzen (H ₂ O LiChrosolv [®] , Merck) !	200 mM Tris • HCl, pH 8,3 15 mM MgCl ₂ • 6 H ₂ O 630 mM KCl 0,5 % Tween 20 10 mM EGTA

2.1.5 Geräte und Zubehör

Utensilien und Werkzeuge der Laborgrundausrüstung (Bechergläser, Pinzetten, Spatel usw.) wurden über die Firma Kobe in Marburg bezogen.

Auffanggefäße für Patientenproben	
Plastik-Röhrchen, 10 ml	Greiner
Plastik-Becher mit Schraubverschluß	Greiner
Autoklav	Gössner, Hamburg
Aqua dest. Anlage	
Research Grade UF / Polishing System	ModuLab Bioscience, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammer für PAA-Gele (vertikal)	BioRad, USA
ELISA Reader Multiscan RC	Labsystems, USA
ELISA Auswertungssoftware <i>Genesis Lite</i> [®] , Vers. 3.0	Life Sciences, UK
Geltrockenanlage	
Model 583 Gel Dryer	BioRad, USA
Hydro Tech Vacuum Pump	BioRad, USA
Hybridisierungsöfen	Memmert
Kühlschränke / Freezer	
4° C	Liebherr
-20° C	Liebherr
- 80° C Sepatech	Hereaus, Hanau
Küvetten für Photometer aus Plastik	
Neubauerzählkammer <i>improved</i>	
pH-Meter pH 537 microprocessor	MAGV Laborbedarf, Rabenau
Photometer	Pharmacia Biotech, Schweden

Pipetten

Eppendorf-Reference
0,5-10 µl, 10-100 µl, 50-250 µl, 200-1000 µl
serologische Pipetten
Multipette
Mehrfach-Pipette

Eppendorf-Gerätebau, Hamburg

Greiner
Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Gilson

Pipettierhilfe Glasfibr pipump

Firma Kobe, Marburg

Pipettenspitzen

0,5-10 µl 20E
10-200 µl Filterspitzen
200-1000 µl Filtertips

Art Mol Bio Products, USA
Brand Micro-Bio-Tech, USA
Eppendorf-Gerätebau, Hamburg

Plastikfolie Saran

Dow Chemicals

Reaktionsgefäße

Falcon Tubes, 50 ml
Falcon Tubes 15 ml
Kryo Tubes (1 ml)
MicroAmp[®] Reaction Caps (8)
MicroAmp[®] Reaction Tubes
MicroAmp[®] Tray Retainer / Assembly
Micro Test Tubes (2,0 ml)
Micro Test Tubes (1,5 ml)
Micro Test Tubes (0,5 ml)

Falcon, USA
Falcon, USA
Greiner
Perkin Elmer, USA
Perkin Elmer, USA
Perkin Elmer, USA
Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Eppendorf-Gerätebau, Hamburg

Reinigungssäulen (Sephadex-650)

Nuc Trap Probe[®]

Stratagene, USA

Röntgenfilme Biomax MR

Kodak, USA

Röntgenfilmentwicklungsgerät

Agfa

Röntgenkassetten Cronex

DuPont, USA

Skalpell, steril No.11

Feather, Japan

Spannungsquelle Power Pack 25

Biometra

Spritzen, steril

10 ml Luer-Lock
20 ml Luer-Lock
50 ml Perfusor-Spritze

B.Braun, Melsungen

B.Braun, Melsungen

B.Braun, Melsungen

Sterilfilter *Millex*[®]-GS 0,22 µm

Millipore, Frankreich

Thermocycler

Gene E
PCR Cycler 2700
PCR Cycler 9700

Techne

Perkin Elmer, USA

Perkin Elmer, USA

Waagen

PE 3600 Delta Range
AE 50

Mettler

Mettler

Whatman Papier	Whatman Lab Sales, USA
Zellschaber	Greiner
Zentrifugen	
Biofuge 15R	Hereaus, Hanau
Minifuge GL	Hereaus, Hanau
Table Top Centrifuge 5415C	Eppendorf-Gerätebau, Hamburg

2.1.6 Zelllinien humaner Tumoren

Um die Eigenschaften und das Verhalten von Tumorzellen *in vitro* genau studieren zu können, isoliert man aus verschiedenen humanen Tumoren Zellen und hält sie in Kultur. Diese Zelllinien sind cytogenetisch genau charakterisiert. Bei den in diesem Projekt verwendeten Zelllinien handelt es sich zum größten Teil um Lungentumorzelllinien. Sie wurden von Frau Dr. Alison Kraus und Frau Cordula Löchelt in RPMI-Medium mit 10 % FKS und L-Glutamin bei 37°C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten und freundlicherweise für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Zelllinie	Tumorart
A 549	Adenokarzinom Lunge
MCF 7	Mammakarzinom
NCI-103 H	großzelliges Lungenkarzinom
U 1752	Plattenepithelkarzinom Lunge
U 1810	großzelliges Lungenkarzinom
NCI-H 69	SCLC
NCI-H 661	großzelliges Lungenkarzinom
NCI-H 82	SCLC
SCLC-24 H	SCLC

Tabelle 2-1: Tumorzelllinien

2.1.7 Patientenmaterial

Alle in diesem Projekt verwendeten Patientenmaterialien stammen ausschließlich aus routinediagnostischen Untersuchungen der Patienten im Klinikalltag. Dabei wurden alle Untersuchungen von erfahrenen Ärzten und Fachärzten des Klinikums der Philipps-Universität in Marburg verrichtet. Es wurde das Patientenmaterial zur Verfügung gestellt, welches nicht für die zytologische Routinediagnostik benötigt wurde. Für diese Arbeit wurde keine zusätzliche Materialgewinnung vorgenommen.

Sämtliche Proben wurden frisch gewonnen, sofort auf Eis oder im Kühlschrank kurz zwischengelagert und so schnell wie möglich weiterverarbeitet. Alle Telomeraseuntersuchungen wurden »blind«, d.h. ohne Kenntnis klinischer Daten durchgeführt. Die Speicherung patientenbezogener Daten erfolgte unter Beachtung des Datenschutzgesetzes.

2.1.7.1 Bronchoskopisch gewonnene Sputen und Lavageproben

Die Bronchoskopie zählt zu den im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführten Untersuchungsmethoden, mit der das menschliche Bronchialsystem von innen betrachtet und Zellmaterial lokal gewonnen werden kann, welches anschließend zytologisch und histopathologisch untersucht wird. Eine Indikation zur Bronchoskopie kann zum Beispiel der Ausschluß eines Tumors bei länger andauerndem Husten, Hämoptysen oder radiologisch verdächtigen schattengebenden Strukturen sein. Routinemäßig wird bei jeder Bronchoskopie Sputummaterial sowie mindestens eine Lavage (Spülflüssigkeit des Bronchialsystems mit isotoner Kochsalzlösung) aufgefangen. Überschüssiges Material (2-6 ml) wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Alle Patienten - mit Ausnahme von potentiell Tuberkulose-positiven Patienten -, die sich im Zeitraum von Oktober 1998 bis Mai 1999 im Hause einer Bronchoskopie unterzogen hatten, wurden in das Projekt aufgenommen.

Laborinterne Bezeichnung ^a	Tumor ^b	Bronchoskopiediagnose
S 001 L 001	ja	zentrales Bronchialkarzinom links
S 002 L 002	ja	peripheres Bronchialkarzinom rechts
S 003 L 003	ja	Bronchialkarzinom rechts
S 004 L 004	V.a.	Rezidiv Adenokarzinom rechts

Laborinterne Bezeichnung^a	Tumor^b	Bronchoskopiediagnose
S 005 L 005	V.a.	Bronchialkarzinom linker Unterlappen
S 006 L 006	ja	zentrales Bronchialkarzinom rechts
S 007 L 007	nein	chron. atrophische Bronchitis
S 008 L 008	V.a.	Bronchial-Neoplasma rechter Oberlappen
S 009 L 009	nein	chron. Bronchitis
S 010 L 010	nein	chron. Bronchitis
S 011 L 011	nein	interstitielle Pneumonie
S 012 L 012	ja	Z.n. Adenokarzinom, Raumforderung ML/UL re.
S 013 L 013	V.a.	Raumforderung unkl Dignität rechter Oberlappen
S 014 L 014	nein	chron. Bronchitis
S 015 L 015	nein	chron. Bronchitis
S 016 L 016	nein	periinfektiöse Hämoptysen
S 017 L 017	nein	Pneumonie rechter Unterlappen
S 018 L 018	nein	V.a. Sarkoidose
S 019 L 019	nein	Purulente Bronchitis
S 020 L 021	nein	chron. Bronchitis
S 021 L 021	nein	chron. Bronchitis
S 022 L 022	nein	Z.n. Adenokarzinom
S 023 L 023	ja	Bronchialkarzinom rechter Unterlappenbronchus

Laborinterne Bezeichnung^a	Tumor^b	Bronchoskopiediagnose
S 024 L 024	nein	chron. Bronchitis
S 025 L 025	nein	diskrete akute Bronchitis
S 026 L 026	nein	portale Lymphome
S 027 L 027	V.a.	Bronchialkarzinom linker Unterlappenbronchus
S 028 L 028	nein	chron. Bronchitis
S 029 L 029	nein	Alveolitis
S 030 L 030	nein	entzündl. Schleimhautveränderungen
S 031 L 031	nein	chron. Bronchitis
S 032 L 032	nein	COPD
S 033 L 033	nein	chron. Bronchitis

a. S = Sputum, L = Lavage

b. laut bronchoskopischer Diagnose

2.1.7.2 Sputen von Station

Zusätzlich zu den über die Bronchoskopie gewonnen Sputen wurden fünf Sputen von stationären Patienten getestet. Bei allen fünf Patienten waren zuvor Lungentumoren diagnostiziert worden. Sie wurden im Rahmen der Etablierung der Methode mituntersucht. Das schriftliche Einverständnis der Patienten wurde zuvor eingeholt.

Laborinterne Bezeichnung	Art des Tumors
St S001	Adenokarzinom Lunge
St S002	Bronchialkarzinom
St S003	Bronchialkarzinom
St S004	Bronchialkarzinom
St S005	Bronchialkarzinom

Tabelle 2-2: Sputen von Patienten auf Station

2.1.7.3 Pleuraergüsse und Aszites

Im Verlauf von bestimmten Erkrankungen kann sich ein Pleuraerguß bzw. ein Aszites ausbilden. Bei beiden handelt es sich um eine Flüssigkeitsansammlung in Form eines Exsudats oder Transsudats. Bei einem Pleuraerguß sammelt sich die Flüssigkeit zwischen den beiden Pleurablättern und kann zu einer Einschränkung der Atemfunktion führen. Ätiologisch wichtig sind neben verschiedenen anderen Ursachen vor allem Infektionen und maligne Tumoren. Die drei häufigsten Ursachen eines malignen Pleuraergusses sind das Bronchialkarzinom, das metastasierende Mammakarzinom und maligne Lymphome (HARRISON et al. 1998).

Bei einem Aszites sammelt sich die Flüssigkeit im Bauchraum. Der Entstehungsgrund sind auch hier vor allem Entzündungen und Tumoren. Dabei verursachen vor allem das Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom, Magen- und Nierentumoren einen Aszites (HARRISON et al. 1998).

Die Punktion eines Ergusses erfolgt zur Diagnostik und zur Therapie mit dem Ziel der Organfunktionsverbesserung (Atmung, Verdauung). Die für diese Arbeit untersuchten Proben stammen von Patienten, die auf Station oder in der Chemotherapie-Ambulanz

punktiert wurden. Manche Patienten wurden dabei im Abstand von einigen Wochen mehrmals punktiert, wobei die Proben getrennt voneinander untersucht wurden.

Laborinterne Bezeichnung	Grunderkrankung
P 1	Mammakarzinom
P 2	Adenokarzinom vom Siegelringtyp Pleura
P 3	V.a. Lungenkarzinom
P 4	V.a. Lungenkarzinom
P 5	Mammakarzinom
P 6	Z.n. Mammakarzinom vor 6 Jahren
P 7	Adenokarzinom Lunge

Tabelle 2-3: Pleurapunktionen

Bei den Punktionsproben P 3 und P 4 konnte der pathologische Befund nicht eindeutig gesichert werden. Aus diesem Grund konnte nur ein Verdacht auf Lungenkarzinom ausgesprochen werden.

Laborinterne Bezeichnung	Grunderkrankung
A 1	Pankreaskopfkarzinom m.Peritonealkarzinose
A 2	Pankreaskopfkarzinom m.Peritonealkarzinose
A 3	Pankreaskopfkarzinom m.Peritonealkarzinose
A 4	Kolonkarzinom
A 5	NHL / CLL
A 6	NHL / CLL

Tabelle 2-4: Aszitespunktionen

Bei den Aszitesproben A 1, A 2 und A 3 handelt es sich um unterschiedliche Punktionsproben des gleichen Patienten in unterschiedlichen Zeitabständen. Sie wurden getrennt voneinander untersucht.

2.1.7.4 Perikardergüsse

Ähnlich wie bei einem Pleuraerguß sammelt sich bei einem Perikarderguß Flüssigkeit zwischen dem parietalen und distalen Blatt des Perikards an. Er kann Folgesymptom einer akuten Perikarditis hervorgerufen durch Infektionen und immunologische Prozesse (z.B. systemischer Lupus erythematoses, rheumatisches Fieber) sowie eines Myokardinfarktes, Urämie und maligner Tumoren sein (HARRISON et al. 1998). Ein Perikarderguß wird zur Vermeidung eines kardiogenen Schocks aufgrund einer Tamponade, aber auch zu diagnostischen Zwecken (Unterscheidung zwischen benignen oder malignem Erguß) punktiert. Bei der Tumorperikarditis stehen das Bronchial-, Mamma- und

Ösophaguskarzinom sowie Leukämien und maligne Lymphome im Vordergrund (HARRISON et al. 1998).

Laborinterne Bezeichnung	Grunderkrankung
PK 1	Mammakarzinom mit gesicherter Perikardkarzinose
PK 2	hochmalignes NHL
PK 3	Bronchialkarzinom
PK 4	kein Tumor bekannt
PK 5	hochmalignes NHL
PK 6	nicht bekannt
PK 7	rezidivierende Perikardergüsse unbekannter Genese

Tabelle 2-5: Perikardpunktionen

Bei der Punktionsprobe PK 6 war keine Grunderkrankung bekannt. Dabei war auch der Grund für den Perikarderguss nicht auszumachen.

2.1.7.5 Oligonucleotide

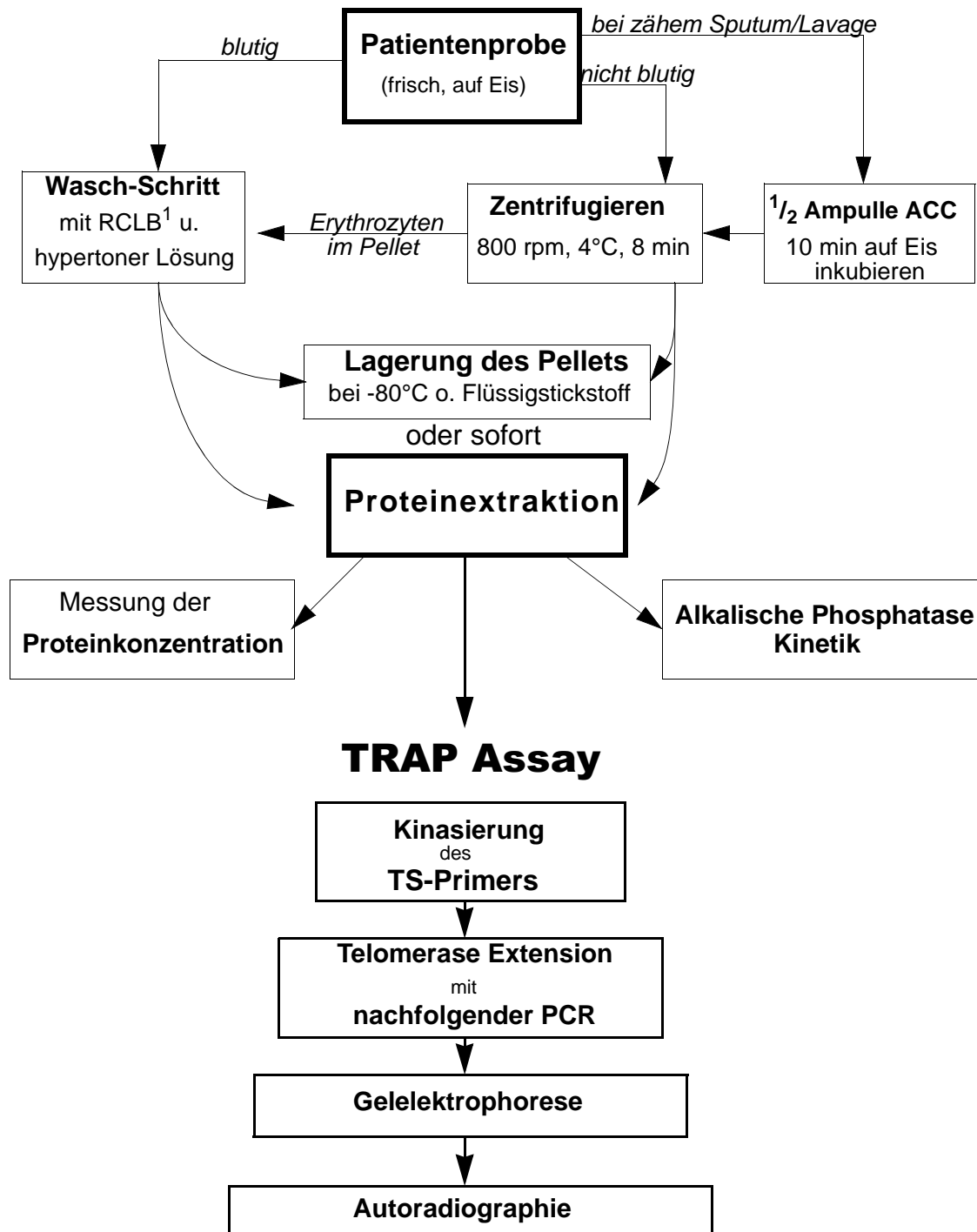
Bei dem TRAP-Assay wurden die folgenden Oligonucleotide verwendet (KIM & WU 1997).

Primer	Sequenz [5'→3']	PCR-Produkt [bp]
TS	AAT CCG TCG AGC AGA GTT	50 + 6x
ACX	GCG CGG CTT ACC CTT ACC CTT ACC CTA ACC	
TSNT	AAT CCG TCG AGC AGA GTT AAA AGG CCG AGA AGC GAT	36 (mit TS)
NT	ATC GCT TCT CGG CCT TTT	

Tabelle 2-6: Sequenzen der TRAP-Oligonucleotide

2.2 Methoden

Ein Telomerase-Assay umfaßt im Allgemeinen die im folgenden Diagramm dargestellten Einzelschritte. Sie werden im Text genau beschrieben.



1. RCLB = Red Cell Lysis Buffer

Abbildung 2-1: Teilschritte eines Telomerase-Assay

Um Kontaminationen des gesamten Telomerase-Assays zu vermeiden, wurden für alle Pipettierschritte Filterpipettenspitzen verwendet. Außerdem wurden für die Vorbereitung und Behandlung aller Patientenproben bei der Proteinextraktion eigens für diese Schritte ausgewählte Pipetten gebraucht, damit keine für PCR vorgesehene Pipetten verunreinigt wurden. Diese Pipetten wurden nach jeder Probenbearbeitung mit 70% Ethanol (vergällt) gesäubert.

Bei Patientenproben jeglicher Art handelt es sich um potentiell infektiöses Material. Aus diesem Grund wurden beim Umgang mit diesen stets Handschuhe getragen. Es wurde ferner immer sorgfältig ohne Verschmutzung der Arbeitsflächen gearbeitet. Alle Überreste wurden mit dem Abfall für infektiöse Materialien entsorgt.

Um eine Abnahme der Enzymaktivität der Telomerase in den Proteinextrakten noch vor der Durchführung des TRAP-Assays zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte auf *Eis* oder in *gekühlten* Zentrifugen und möglichst *zügig* (aber sorgfältig) durchgeführt.

2.2.1 Proteinextraktion

2.2.1.1 Proteinextraktion aus Zelllinien

Für die Präparation eines Proteinextraktes wurden die Zelllinien in mittleren Zellkulturflaschen in RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin in Kultur gehalten. Bei einer Zelldichte von 80 % wurde die Proteinextraktion durchgeführt. Alle hierfür notwendigen Arbeitsschritte wurden unter keimarmen Bedingungen verrichtet.

2.2.1.1.1 Extraktion aus adhärenenten Zellen

Das in einer mittleren Zellkulturflasche enthaltene Medium wurde vollständig abgenommen und verworfen. Um Mediumrückstände zu entfernen, wurden die Zellen in der Kulturflasche mit 4 ml eisgekühltem 1 × PBS gewaschen. Dabei wurde die Kulturflasche mit dem PBS einige Male sanft hin- und hergewogen, bevor es wieder abpipettiert wurde. Die Zellen wurden in der Flasche auf Eis gelagert, während nun der Lysispuffer in einem Volumen von 1 ml angesetzt wurde (siehe Kapitel 2.1.4 Puffer und Lösungen). Das im Lysispuffer enthaltene PMSF ist ein Proteaseninhibitor, der die Proteinuntereinheiten der Telomerase vor Degradation durch ubiquitär vorfindbare Proteasen schützen soll. Es ist in wässriger Lösung nur circa 30 min stabil (Herstellerhinweis), so daß der Lysispuffer immer frisch angesetzt wurde. Auf den Inhalt einer mittleren Zellkulturflasche wurden nun die gesamten 1 ml des

Lysispuffers gegeben und dabei darauf geachtet, daß der Boden gut bedeckt ist. In waagerechter Position wurde die Flasche auf Eis gelagert und 10 min inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit Hilfe eines sterilen Zellschabers vorsichtig von der Unterfläche abgehoben und mit einer serologischen Pipette in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde nun zentrifugiert (15 000 rpm, 4°C, 20 min).

Anschließend wurde der Überstand, in dem sich die Proteine befanden, in fünf beschriftete Kryotubes aliquotiert und sofort bei -80°C eingefroren. Bei dieser Temperatur ist der Proteinextrakt über ein Jahr lang haltbar. Ein Aliquot von 20 µl Extrakt wurde in ein 0,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und für die Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 2.2.2) verwendet.

2.2.1.1.2 Extraktion aus nicht adhärenen Zellen

Der komplette Inhalt einer mittleren Zellkulturflasche (Medium mit Zellen in Suspension) wurde mit einer serologischen Pipette in ein steriles 50 ml Falcon Tube überführt. Die Suspension wurde zentrifugiert (800 rpm, 4°C, 4 min), so daß sich ein Sediment aus Zellen bildete. Der Überstand bestehend aus Medium wurde vollständig abdekantiert und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 4 ml eisgekühltem 1×PBS homogenisiert und so gewaschen. Für eine Zellzählung wurde ein Aliquot von 100 µl abgenommen. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugierschritt (800 rpm, 4°C, 4 min). In der Zwischenzeit fand die Zellzählung statt (siehe Kapitel 2.2.1.1.3). Außerdem wurde 1 ml des Lysispuffers angesetzt (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.2.1.1.1.). Nach Beendigung des Zentrifugierschrittes wurde der Überstand aus PBS entfernt. Das erforderliche Volumen des Lysispuffers richtete sich nach der Zellzahl. Um optimale Lysisverhältnisse zu schaffen, wurden dabei je 10⁶ Zellen mit jeweils 200 µl Lysispuffer versetzt. Er wurde nun mit dem Zellpellet im Falcon Tube vorsichtig homogenisiert. Es erfolgte eine Inkubation von 10 min auf Eis.

Anschließend wurde die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (15 000 rpm, 4°C, 20 min) und den Überstand danach wie in Kapitel 2.2.1.1.1. aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.1.1.3 Zellzählung

Die Zellzählung wurde in einer »Neubauerkammer *improved*« durchgeführt.

Dafür wird zunächst die Zählkammer und ein Deckglas mit 70% Ethanol (vergällt) gereinigt. Nun muß das Deckglas fest auf die Neubauerkammer gedrückt werden. Leichtes Befeuchten der Kammerränder erleichtert den luftfreien Abschluß zwischen Deckglas und den Rändern

der Zählkammer. Anschließend wurden 100 µl einer Zellsuspension in PBS gelöst behutsam in den Zentralkanal der Kammer pipettiert. Bei 400facher Vergrößerung wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Erkennbar wurde das Raster der Zählkammer. Man zählte alle vier Quadrate aus und bildete den Mittelwert für ein Quadrat, dessen Volumen einem Mikroliter entspricht. So erhielt man die Zellzahl pro Mikroliter.

2.2.1.2 Proteinextraktion aus Sputum und Lavage

Die frisch gewonnenen Patientenproben wurden auf Eis transportiert. Um eine möglichst große Angriffsfläche für den Lysispuffer in einem späteren Schritt zu schaffen, mußte das zähe Sputum und unter Umständen auch die Lavage mit einer Ampulle ACC vorbehandelt werden. Der darin enthaltene Wirkstoff Acetylcystein gehört zur Substanzklasse der Mukolytika und vermindert die Viskosität der Probe durch reduktive Öffnung der Disulfidbrücken im Proteinanteil des Mucus. Nach Zugabe $\frac{1}{2}$ Ampulle ACC (= 150 mg Acetylcystein) wurde nach gutem Durchmischen die Probe 10 min auf Eis inkubiert. Für den anschließenden Zentrifugierschritt wurden die Proben in dünne Plastikröhrchen überführt und bei 800 rpm, 4°C, 10 min zentrifugiert. In dieser Zeit wurde Lysispuffer (1 ml pro Probe) angefertigt. Die Zusammensetzung entsprach der in Kapitel 2.2.1.1.1.

Nach Beendigung des Zentrifugierens wurde der Überstand mit großer Sorgfalt abpipettiert und entsorgt. Das Zellpellet wurde - je nach Menge des Pellets - mit 600-1000 µl des Lysispuffers resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert.

Es schloß sich der bereits beschriebene Zentrifugationsschritt an, bei dem die Probe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 15 000 rpm, 4°C und 20 min repelletiert wurde. Der Überstand wurde in Kryotubes aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.3 Proteinextraktion aus Punktionsproben (Pleuraergüsse, Perikardergüsse)

Bei der Gewinnung der Punktionsproben ist oft eine Beimischung von Blut unvermeidbar. Dieses ist entweder punktionsbedingt, d.h. bei der Punktion wurde akzidentell ein kleines Haut- oder Muskelgefäß mit der Kanüle durchstoßen, oder es stammt vom Exsudat oder Transsudat direkt.

Das Blut mußte vor Durchführung der eigentlichen Proteinextraktion aus der Probe möglichst vollständig entfernt werden, weil Blut das Enzym *Taq*-Polymerase hemmt, welches in der

später beschriebenen PCR benötigt wurde (ABU AL-SOUD & RADSTROM 1998, AL-SOUD ET AL. 2000).

Hatte die Patientenprobe bereits beim Betrachten mit bloßem Auge eine blutrote Farbe, so wurde der Proteinextraktion direkt ein im Folgenden beschriebener Waschschrift mit RCLB vorangestellt. War dies nicht der Fall und besaß die Probe ein eher gelbliches Aussehen, so wurde wie folgt vorgegangen: Die Probe, die entweder in einer Spritze oder einem Blutröhrchen mit Li-Heparin auf Eis transportiert worden war, wurde in ein steriles 50 ml Falcon Tube überführt. Dieses wurde bei 800 rpm, 4°C 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abdekantiert. Waren noch einige Erythrozytenhaufen sichtbar, so wurde erneut ein Waschschrift mit RCLB durchgeführt. Wurden mit bloßem Auge keine hämoglobinhaltigen Zellhaufen erkannt, so wurde die Proteinextraktion direkt angeschlossen.

2.2.1.3.1 Waschschrift mit RCLB

Zur Entfernung der Erythrozyten aus dem Punktat wurde dieses in einem sterilen 50 ml Falcon Tube mit 1 Vol. RCLB versetzt. Entscheidend für das Gelingen des Waschvorgangs und der anschließenden Proteinextraktion war eine vollständige Homogenisierung, ohne jedoch zu große Scherkräfte auszuüben. Die Suspension wurde ca. 5 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die 5×Stocklösung der hypertonen Lösung in einem 2 ml Eppendorf Gefäß auf eine 1×hypertone Lösung (HL) herunter verdünnt. Dies geschah wegen der geringen Stabilität der 1×HL stets kurz vor Gebrauch. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 0,3 Vol. 1×HL zu der Suspension hinzugegeben beides durch langsames und vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Danach wurde die Probe mit 800 rpm bei 4°C 8 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand möglichst vollständig abdekantiert. Waren jetzt immer noch Erythrozyten im Sediment erkennbar, so wurde der gesamte Vorgang wiederholt. Dies geschah allerdings nicht öfter als drei Mal, um zu große Einbußen in der Enzymaktivität wegen langer Behandlungsdauern zu vermeiden. Das am Ende des Waschvorganges blutfreie Zellpellet war nun der eigentlichen Proteinextraktion zugänglich.

2.2.1.3.2 Durchführung der Extraktion

Die Zellausbeute schwankte bei den Punktionsproben sehr. Je nach Größe des Pellets (im Vergleich dieses Pellets mit der Pelletgröße von Zelllinien mit bekannter Zellzahl) wurden zwischen 200 und 1200 µl Lysispuffer benötigt. Um aber eine zu große Streubreite bei der Konzentration der Proteinextrakte zu vermeiden und um optimale Volumenverhältnisse zu haben, wurde immer mit circa 200 µl Lysispuffer pro 10^6 Zellen lysiert. Für exakte Ergebnisse

zu erzielen, wurde der Proteinextraktion eine Zellzählung vorangestellt. Aufgrund des Zeitverlustes durch den Waschschrift mit RCLB wurde jedoch eine weitere Verzögerung umgangen, indem die Schätzung der Pelletgröße durch Vergleich mit gezählten Zellen von Zelllinien herangezogen wurde.

Vor der Durchführung der Extraktion mußte auch hier wieder der Lysispuffer neu angesetzt werden. Die Menge umfaßte immer mindestens 500 µl, um Pipettierungenauigkeiten bei den kleinen Volumina gering zu halten. Die Zusammensetzung für 1 ml Lysispuffer entnehme man Kapitel 2.2.1.1.1. Das Zellpellet wurde mit dem Lysispuffer homogenisiert, 10 min auf Eis inkubiert, in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und danach bei 15 000 rpm und 4°C 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde - wie bereits in vorangegangenen Kapiteln beschrieben - aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Proteinextrakte wurde photometrisch bestimmt. Dies wurde mit Hilfe des BioRad DC Protein Assay-Kits durchgeführt, wobei das Protokoll des Herstellers modifiziert wurde. Zunächst wurde in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen eine aufsteigende Konzentrationsreihe einer Standardproteinlösung (BSA) bekannter Konzentration inklusive eines Nullwertes angefertigt. Das Gesamtvolumen des BSA in Wasser (Merck LiChrosolv® H₂O) umfaßte 200 µl. Alle Proben wurden in dreifachem Ansatz gemessen, um danach Mittelwerte der Absorptionen berechnen zu können. Entsprechend wurde mit dem gleichen Gesamtvolumen eine aufsteigende Konzentrationsreihe des zu messenden Extraktes ebenfalls in dreifachem Ansatz hergestellt. Nun wurde pro Ansatz 100 µl der Lösung A' (bestehend aus 1000 µl Lösung A + 20 µl Lösung S des BioRad Kits) hinzu pipettiert und gevortext. Anschließend wurden 800 µl Lösung B auf jeden Ansatz gegeben, nochmals gevortext, und der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur an einem dunklen Ort inkubiert. Nach Kalibrierung des Nullwertes wurden zunächst die Absorptionen der Standardproteinreihe bei einer Wellenlänge von 750 nm in einer 0,5 mm Einwegküvette mit einem digitalen Photometer gemessen. Anschließend wurden die Absorptionen der Extrakte festgestellt. Absorptionswerte zwischen 0,01 und 0,15 ergaben eine hinreichende Meßgenauigkeit. Nach Erstellen einer Standardmeßgeraden konnten die Proteinkonzentrationen der Extrakte indirekt an dieser abgelesen werden. Die zugehörige Einheit war µg/µl. Proteinkonzentrationen von weniger als 0,5 µg/µl oder mehr als 6 µg/µl befanden sich außerhalb des Meßbereiches und konnten mit diesem System nicht mehr erfaßt werden. In diesen selten eintretenen Fällen wurde einfach eine Konzentration von weniger als

0,5 oder mehr als 6 µg/µl vermerkt. In der Mehrzahl der Fälle bewegten sich die Proteinkonzentration aber innerhalb diesen Bereiches.

2.2.3 Alkalische Phosphatase Enzymkinetik

Um eine hinreichende Kontrolle über die Qualität des Proteinextraktes zu besitzen, wurde über eine Enzymkinetik die Aktivität eines Referenzenzym, der Alkalischen Phosphatase, gemessen. Die Alkalische Phosphatase ist in allen Zellen enthalten und sollte sich demnach auch im Proteinextrakt befinden. Es ist jenes Enzym, welches für Telomerase als Referenzenzym herangezogen wird (WRIGHT et al. 1995, HEINE et al. 1998).

Die Kinetik wurde mit Hilfe des Substrates pNPP durchgeführt. Es wird durch die Alkalische Phosphatase gespalten. Dabei findet ein Farbumschlag statt, der dann gemessen wird (GREILING & GRESSNER 1995).

Als Standard wurde reine Alkalische Phosphatase in ausreichender Verdünnung verwendet. In einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit planem Boden wurde zunächst eine aufsteigende Konzentrationsreihe des Alkalische Phosphatase Standards in den Verdünnungen 1:100 000, 1:10 000, 1:1 000 und 1:100 vorgelegt. Ein Nullwert, der statt des Standards Wasser enthielt, stand am Anfang der Konzentrationsreihe. Die Mikrotiterplatte befand sich zu allen Pipettierschritten auf Eis. Die zu messenden Extrakte wurden nun rasch aufgetaut. Ebenfalls in einer aufsteigenden Reihe inklusive Nullwert wurden die Extrakte in das 96-Well-Plate gegeben. Dabei wurde ein bestimmtes Volumen in der Mikrotiterplatte vorgelegt und mit Wasser ad 10 µl aufgefüllt. Abbildung 2-2 stellt das Pipettierschema bildlich dar. Sofort nach Gebrauch wurden die Proteinextrakte auf Trockeneis zwischengelagert und möglichst schnell wieder bei -80°C eingefroren.

Die weiteren Schritte wurden in einem abgedunkelten Raum vorgenommen. In einem 2 ml Reaktionsgefäß, welches mit Aluminiumfolie lichtgeschützt wurde, wurde nun das Substratgemisch aus 2 ml 100mM Na-Bicarbonat Puffer, pH 10,0 und 100 µl pNPP angesetzt. Nach kurzem Vortexen wurde mit einer Multipette vorsichtig 100 µl dieses Substanzgemisches auf jede Probe in der Mikrotiterplatte gegeben. Es folgte eine Inkubationsperiode von 20 min bei 37°C lichtgeschützt in einem Hybridisierungssofen. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion bei 85°C für 5 min gestoppt. Anschließend wurde der Farbumschlag, der sich proportional zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase verhielt, bei 405 nm photometrisch in einem ELISA-Reader gemessen. Die Aufzeichnung und die

Auswertung der Werte erfolgte mit Hilfe der Software »Labsystems Genesis 3.0« nach der Anleitung des Herstellers.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	100,000	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl			
C	1:10,000	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl			
D	1:1,000	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl			
E	1:100											
F												
G												
H												

Abbildung 2-2: Pipettierschema bei der Alkalischen Phosphatase Kinetik

Dargestellt ist eine Mikrotiterplatte mit dem Standard in Spalte 1 und acht Proteinextrakten in den Spalten 2 bis 9. Der Nullwert ist jeder Konzentrationsreihe vorangestellt. Die in der Abbildung dargestellten Extraktvolumina wurden immer ad 10 µl mit Wasser aufgefüllt werden, bevor das Substratgemisch (Puffer mit pNPP) hinzupipettiert wurde.

2.2.4 TRAP-Assay im Allgemeinen

Der TRAP-Assay (»*Telomeric Repeat Amplification Protocol*«) ist eine elegante und sensitive Methode, in einem einzigen Reaktionsgefäß Telomeraseaktivität in Proteinextrakten nachzuweisen. Der in dieser Arbeit beschriebene TRAP-Assay basiert zwar grundlegend auf seiner »klassischen Beschreibung« (KIM et al. 1994), wurde aber aus Gründen der Sensitivität in vielen Komponenten abgeändert.

Jeder TRAP-Assay besteht aus zwei verschiedenen Teilen, die zeitlich hintereinander ablaufen (KIM et al 1994). Dazu gehört

1. Telomerase Extensionsschritt
2. anschließende PCR.

2.2.4.1 Telomerase Extensionsschritt

Zunächst findet im Ablauf des TRAP-Assays der Telomerase-Verlängerungsschritt statt. Hierbei wird der Telomerase eine DNA-Matrize in Form eines spezifischen, radioaktiv markierten Oligonucleotids von 18 bp Länge (TS-Oligonucleotid) angeboten. Die RNA-Untereinheit der Telomerase ist mit drei ihrer Basen komplementär zu dem 3'-Ende des TS-Oligonucleotids und hybridisiert hier mit diesem (siehe Abbildung 2-3). Bei optimalen Versuchsbedingungen (37°C, TRAP-Puffer, dNTPs) polymerisiert die katalytische Untereinheit der Telomerase die typische telomerische Basenabfolge aus sechs Basen [TTAGGG], die man auch Tandem-Repeats nennt, an das TS-Oligonucleotid. Nach jeder Polymerisierung eines 6-Basen Repeats löst sich die Telomerase wieder von der Matrize ab und rückt entlang des neu synthetisierten Stranges in 3'-Richtung weiter. Sie hybridisiert wieder mit den letzten Basen des 3'-Endes des verlängerten TS-Primers und synthetisiert erneut ein telomerisches Repeat. Das TS-Oligonucleotid wird somit um ein Vielfaches dieser 6-Basen Sequenz verlängert $[18+6x]\text{bp}$.

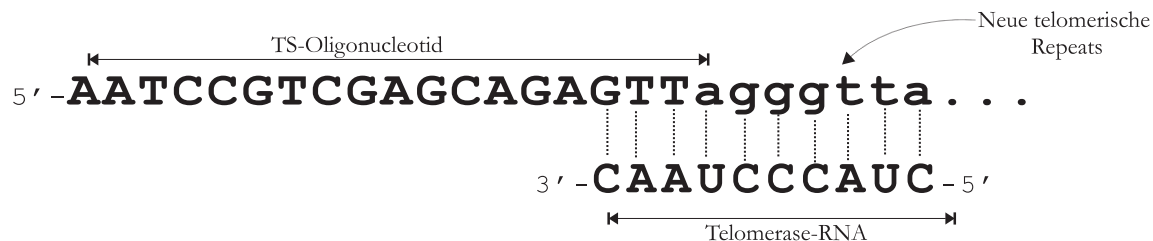


Abbildung 2-3: Telomerase Extensionsschritt

Die RNA-Untereinheit der Telomerase hybridisiert mit drei Basen des 3'-Endes des TS-Primers und verlängert unter optimalen Bedingungen das TS-Oligonucleotid um ein neues telomerisches Repeat. Anschließend disloziert die Telomerase, kann erneut am 3'-Ende des verlängerten TS-Primers anlagern und diesen um sechs weitere Basen verlängern. Dieser Extensionsschritt wird durch Denaturierung des Enzyms bei 95°C für 30 sec beendet.

Nach Ablauf einer bestimmten Zeit (20 min) wird die Telomerase Extensionsreaktion durch Denaturierung des Enzyms bei 95°C für 30 sec gestoppt. Es schließt sich die Polymerasekettenreaktion an.

2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei dieser Reaktion findet die Vervielfältigung (Amplifikation) des im Telomerase Extensionsschritt entstandenen Produktes statt.

Die Polymerasekettenreaktion - kurz PCR - macht es möglich, ganz bestimmte Abschnitte eines DNA-Stranges beliebiger Herkunft in einem zellfreien System zu amplifizieren, um somit diese DNA-Abschnitte detektierbar zu machen (MULLIS & FALOONA 1987, SAIKI et al. 1988).

Für eine Standard-PCR benötigt man zunächst zwei Oligonucleotide (Primer), die jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge des zu vervielfältigenden Abschnittes komplementär sind und

so mit diesem hybridisieren können. Weiterhin sind ausreichende Mengen an dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP äquimolar) und eine thermostabile DNA-Polymerase erforderlich. Dabei handelt es sich um die *Taq*-Polymerase, welche aus dem Bakteriums *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde.

Zu Beginn wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 94-96°C denaturiert und so in Einzelstränge zerlegt. Die anschließende Abkühlung auf 50-65°C ermöglicht das Anlagern der Primer („Annealing“). Bei der darauf folgenden „Elongation“ werden ausgehend von den Primern bei 72°C jeweils in 5'→3'-Richtung komplementäre Tochterstränge von der *Taq*-Polymerase neu synthetisiert. Dieser Zyklus aus *Denaturierung* → *Annealing* → *Elongation* wird mit dem selben Reaktionsansatz 25-35 mal wiederholt. Die neu synthetisierten Stränge dienen bei jedem neuen Zyklus wiederum selbst als Matrizen, so daß insgesamt eine Kettenreaktion stattfindet. Schon ab dem dritten Zyklus bilden sich Doppelstränge, deren Länge genau dem Abstand der Primer entspricht. Mit jedem Zyklus erhöht sich der Anteil dieser DNA-Abschnitte mit der Zielsequenz auf etwa das Doppelte, so daß theoretisch nach n Zyklen eine Anzahl von maximal 2^n Molekülen dieser Art im Reaktionsansatz vorhanden ist. Es erfolgt also eine logarithmische Vervielfältigung der Target-Sequenz. Zur Sicherstellung der vollständigen Polymerisierung aller DNA-Fragmente wird ein abschließender Elongationsschritt durchgeführt.

Bei der Polymerasekettenreaktion, wie sie im TRAP-Assay stattfindet, handelt es sich um eine Sonderform der PCR. Anders als bei der oben beschriebenen Standard-PCR, bei der ein natürlicher DNA-Strang zur Amplifikation vorgelegt wird, bildet bei der TRAP-PCR das im Telomerase-Extensionsschritt verlängerte TS-Oligonucleotid die DNA-Matrize. Es hat - je nachdem wieviele [TTAGGG]-Repeats angefügt wurden - eine Länge von [18+6x] bp. Eine weitere Besonderheit ist, daß das TS-Oligonucleotid nicht nur Template für die Telomerase ist, sondern in dieser PCR in nicht verlängerter Form auch den *forward*-Primer darstellt. So wird sicher gestellt, daß nur im ersten Schritt neu synthetisierte Telomerrepeats und nicht etwa die normal existierenden Telomere der lysierten Zelle amplifiziert werden. Als *reverse*-Primer dient das Oligonucleotid ACX. Die Sequenzen entnehme man bitte Tabelle 2-6. Nach der PCR kann man also nicht nur eine Zielsequenz mit einer bestimmten Länge erwarten, sondern erhält eine feststehende Reihe von definierten DNA-Abschnitten mit jeweils 6 bp Abstand. Diese werden in einem Gel als »TRAP-Leiter« sichtbar.

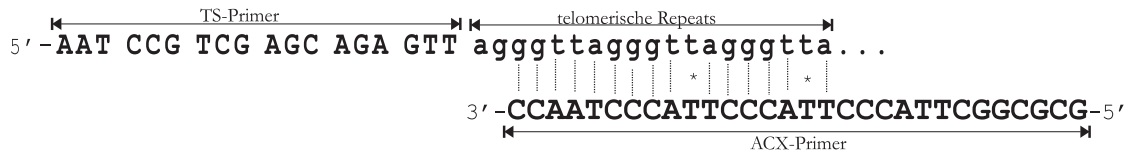


Abbildung 2-4: Annealing des ACX-Primers bei der PCR

Der ACX-Primer ist der *reverse*-Primer der TRAP-PCR. Dabei fällt auf, daß beim Annealing an die im Telomerase Extensionsschritt neu synthetisierten telomerischen Repeats Mismatches auftreten (*). Diese erhöhen die Spezifität (Kim et al. 1994).

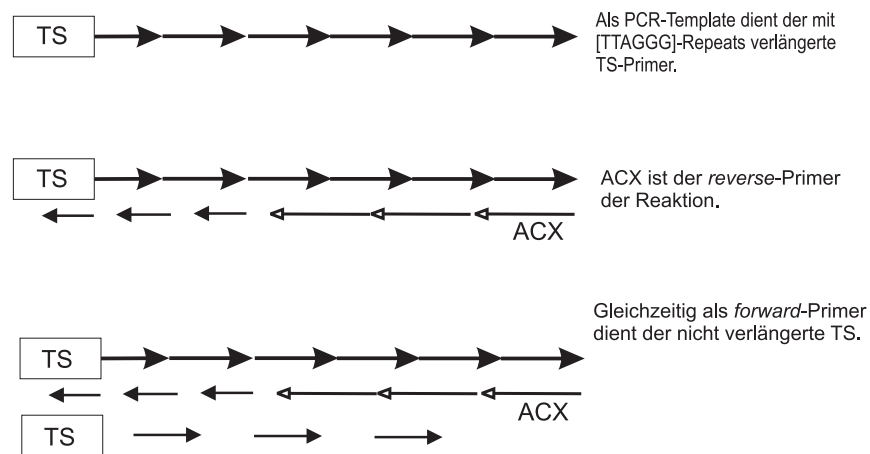


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der TRAP-PCR

Das TS-Oligonucleotid dient bei dieser PCR als *forward*-Primer, ACX ist der *reverse*-Primer. Die DNA -Matrize ist der der um (TTAGGG)_x verlängerte TS-Primer.

Beide in den letzten Abschnitten beschriebenen TRAP-Teilschritte können bei einer entsprechend ausgewählten Versuchsanordnung in einem Reaktionsgefäß zeitlich direkt nacheinander ablaufen. Dies wird im folgenden Kapitel 2.2.5. dargestellt.

2.2.5 TRAP-Assay im Speziellen

2.2.5.1 Kinasierung des TS-Primers

Zur Detektion der bei einer PCR amplifizierten DNA-Abschnitte gibt es zahlreiche Möglichkeiten. Eine Methode von besonders hoher Sensitivität ist die radioaktive Markierung eines der verwendeten Primer. Beim TRAP-Assay bietet sich der TS-Primer besonders an, weil dieser PCR-Primer und Telomerase-Template zugleich ist. Die radioaktive Markierung erfolgte mittels einer Kinasierungsreaktion. In einem 15 µl Ansatz wurde das TS-

Oligonucleotid mit $[\gamma^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ und einer T_4 -Polynucleotidkinase versetzt. Bei optimalen Reaktionsbedingungen wurde der radioaktive Phosphatrest vom C_5 -Atom des ATP auf den TS-Primer übertragen. Dadurch trug dieser ein radioaktives Phosphatlabel des Isotops ^{33}P , einem β -Strahler mit einer Halbwertszeit von circa 14 Tagen. Tabelle 2-7 gibt den angewendeten Kinasierungsansatz wieder.

	Mix für 10 \times Ansatz
$[\gamma^{33}\text{P}]\text{-ATP}$	4-5 μl
TS-Primer	1,2 μg
5 \times Forward Kinase Puffer	3 μl
T_4 -Polynucleotidkinase	5 U
H_2O	ad 15 μl
Gesamt Volumen	15 μl

Tabelle 2-7: Kinasierungsansatz 1

2.2.5.2 Ansatz eines TRAP-Assays

Wie schon in Kapitel 2.2.4. TRAP-Assay im Allgemeinen dargestellt, fanden beide Teilreaktionen eines TRAP-Assays in einem Reaktionsgefäß statt. Um eine Erhöhung der Sensitivität und Spezifität zu erreichen, hatte sich eine räumliche Trennung der beiden Reaktionsgemische durch eine Wachsschicht als optimal erwiesen.

Erst während des primären Denaturierungsschrittes bei Beginn der eigentlichen PCR werden durch das Schmelzen der Wachsschicht die beiden Reaktionsgemische und somit die beiden Primer zusammengeführt. Dabei muß aufgrund der zusätzlichen Schritte bei der

Durchführung möglichst zügig gearbeitet werden, um eine Abnahme der Enzymaktivitäten sowohl der Telomerase als auch der *Taq*-DNA-Polymerase zu vermeiden.

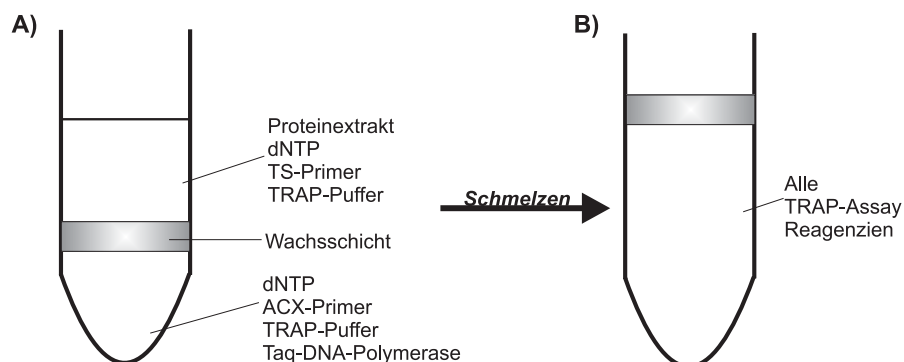


Abbildung 2-6: Versuchsanordnung beim TRAP-Assay mit Wachsschicht

A) Während des Telomeraseextensionsschrittes sind TS- und ACX-Primer räumlich voneinander getrennt.
 B) Kurz vor der PCR wird das Wachs geschmolzen und so die räumliche Trennung aufgehoben und alle Reagenzien für die PCR zusammengeführt.
 Durch die räumliche Trennung der Reagenzien während des Extensionsschrittes konnte die Sensitivität und Spezifität des TRAP-Assays verbessert werden.

Zunächst wurden 5 µl von Mix 1 in ein steriles *MicroAmp*[®] Reaktionsgefäß vorgelegt. Dabei wurden die Bestandteile dieses Mixes erst beim PCR-Schritt benötigt.

Tabelle 2-8 zeigt die Zusammensetzung von Mix 1 pro Ansatz. Alle Reaktionsgefäße und darin enthaltene Reaktionsgemische wurden von nun an immer auf Eis zwischengelagert.

10 × TRAP-Puffer	0,5 µl
ACX-Primer	12 pmol
<i>Taq</i> -Polymerase	2 U
H ₂ O	ad 5 µl
Gesamt-Volumen	5 µl

Tabelle 2-8: Ansatz für Mix 1

Anschließend wurde mit einem sterilen und spitzen Einwegskalpell je eine Wachskugel (AmpliWAX[™] PCR Gem 100) in jedes Reaktionsgefäß überführt. Um das Wachs zu schmelzen und eine fest verschlossene Wachsschicht über den 5 µl des vorgelegten Mixes 1 zu erhalten, wurde jeder Ansatz in einem Thermocycler zuerst 5 min auf 80°C erhitzt und danach auf 25°C

1 min abgekühlt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit Inhalt auf Eis gelagert, um eine Aktivitätsabnahme der *Taq*-Polymerase gering zu halten.

Parallel mit Mix 1 wurde auch schon Mix 2 in einem getrennten Gefäß angesetzt. Dieser enthielt alle restlichen für den TRAP-Assay erforderlichen Substrate. Er beinhaltete pro Ansatz:

Proteinextrakt	1-3 µg
10 × TRAP-Puffer	4,5 µl
RNAse Inhibitor	8 U
dNTP ^a -Mix	0,125 µl
³³ P-TS-Primer	13,4 pmol
H ₂ O	ad 45 µl
Gesamt-Volumen	45 µl

Tabelle 2-9: Ansatz für Mix 2

a. Äquimolarer Mix aus dATP, dCTP, dTTP und dGTP

Der Zusatz des RNAse Inhibitors schützte den RNA-Anteil der Telomerase vor ubiquitär vorkommenden RNAsen.

Nach Abkühlen des Reaktionsgefäßes mit Mix 1 und der Wachsschicht wurde der Proteinextrakt mit äußerster Vorsicht auf die Oberfläche der geschlossenen Wachsschicht pipettiert, ohne diese jedoch zu durchdringen. Anschließend wurde die Menge von

45 µl minus Vol.[Proteinextrakt] hinzugegeben, und man ließ den Reaktionsansatz folgende Temperaturabfolge in einem Thermocycler durchlaufen:

1 Zyklus	30°C 20 min	Extension
1 Zyklus	94°C 30 sec	PCR
29 Zyklen	94°C 30 sec	
	58°C 30 sec	
	72°C 30 sec	
1 Zyklus	72°C 30 sec	
∞	4°C	

Tabelle 2-10: Temperaturprofil des TRAP-Assays

Eine längere Lagerung der TRAP-Proben erfolgte bei -20°C.

2.2.5.3 PCR mit Interner Kontrolle

Der TRAP-Assay kann durch Zugabe einer internen Kontrolle semiquantifiziert werden. Dies geschieht durch die während Ablauf des TRAP-Assays parallele Amplifikation eines dem TRAP-Ansatz zugefügten DNA-Oligonucleotids (TSNT) mit Hilfe der Primer TS und NT. Beide zusätzlichen Oligonucleotide NT und TSNT werden dann Mix 1 beigelegt. Gleichzeitig dient die Amplifikation der internen Kontrolle auch dem Ausschluß der Anwesenheit von PCR-Inhibitoren (KIM & WU 1997). Aus Sensitivitätsgründen wurde aber in dieser Arbeit auf das gleichzeitige Zufügen der internen Kontrolle verzichtet. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren mußte in einer zweiten Reaktion ausgeschlossen werden. Dabei entsprach das

Temperaturprofil dem des TRAP-Assays. Der Ansatz von Mix 1 veränderte sich dementsprechend:

10 × TRAP-Puffer	0,5 µl
ACX-Primer	12 pmol
TSNT-Oligonucleotid	0,1 amol
NT-Primer	0,1 µg
<i>Taq</i> -Polymerase	2 U
H ₂ O	ad 5 µl
Gesamt-Volumen	5 µl

Tabelle 2-11: Mix 1 mit interner Kontrolle

2.2.6 Gelelektrophorese

2.2.6.1 Allgemeine Beschreibung der Gelelektrophorese

DNA-Moleküle tragen bei neutralem pH - bedingt durch ihre Phosphatreste - eine negative Ladungen. In einem elektrischen Feld wandern sie zur Anode. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Elektrophorese zu Nutze, um sie aufzutrennen. Trägerstoffe der Elektrophorese können Agarose- oder Polyacrylamidgele sein. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA ist abhängig von der Gesamtladung, der Molekülgröße, seiner Konformation, der Matrix-Porengröße sowie von der elektrischen Feldstärke. Die Agarose- bzw. Acrylamidkonzentration bestimmt die Porengröße eines Gels.

Polyacrylamidgele werden zur Auftrennung von Fragmenten bis zu 1500 bp verwendet, während Agarosegele in verschiedener Konzentration längere Fragmente (200 - 50 000 bp) auftrennen können (SAMBROOK et al. 1989).

Zur Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente gibt es verschiedene Methoden mit unterschiedlicher Sensitivität. Die Visualisierung der DNA mit Ethidiumbromid ist eine Möglichkeit. Ethidium ist ein aromatisches Kation, welches zwischen DNA-Doppelstränge interkaliert und durch Anregung mit UV-Licht (302 nm) fluoresziert (560 nm). Unter einem Transilluminator können so die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden. Eine andere weitaus sensitivere Methode ist die Autoradiographie bei radioaktiven PCRs. Durch Exposition eines entsprechenden Röntgenfilms auf dem Gel über mindestens 16 Stunden können die radioaktiven DNA-Moleküle nach Entwicklung des Films visualisiert werden.

Vor dem Auftragen auf ein Gel werden die Proben mit einem Gelladepuffer versetzt. Dieser erhöht die Dichte der Lösung, so daß sie gleichmäßig in die Geltaschen absinkt. Zusätzlich

beinhaltet der Ladepuffer die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, die ebenfalls im elektrischen Feld Richtung Anode wandern. Sie ermöglichen eine Abschätzung der aktuellen Lauflänge und vereinfachen ferner die Beladung der Taschen. DNA-Längenstandards ermöglichen durch Vergleich mit ihnen die Größenbestimmung der aufgetrennten Fragmente.

2.2.6.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden aus Gründen der Sensitivität ausschließlich Polyarylamidgele für die elektrophoretische Auftrennung der TRAP-PCR-Produkte verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie.

Tabelle 2-12 zeigt die Zusammensetzung des PAA-Gels:

	PAA-Gel
Acrylamid-konzentration	12 %
Gelgröße	17,0 cm × 15,5 cm × 0,5 mm
Acrylamidlösung 12 % × 1/2 TBE	30 ml
APS 10%	250 µl
TEMED	25 µl

Tabelle 2-12: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels

Eine Acrylamidlösung enthält Acrylamid-Monomere. Durch freie Radikale, die aus dem chemischen Zerfall von APS stammen und in Gegenwart von TEMED stabilisiert werden, polymerisieren diese Monomere in einer Kettenreaktion zu langen Ketten. Durch Einbau von N,N'-Methylenbisacrylamid werden diese zusätzlich quervernetzt, so daß ein Polyacrylamidgel entsteht.

Zur Herstellung eines solchen Gels wurden zwei Glasplatten mit zwischengelegten Spacern (0,5 mm) und einem dünnen Silikonschlauch zusammengeklammert. Alle Materialien wurden vorher mit Isopropanol gereinigt. In einem Becherglas wurden nun die Substanzen vermengt (siehe Tabelle 2-12). Für eine vollständige und gleichmäßige Polymerisation wurde die Lösung vor dem Gießen gründlich gemischt. Danach wurde sie zügig zwischen die Glasplatten gegossen, und ein Kamm mit 16 Taschen à 30 µl wurde an der Oberkante eingeschoben. Das Gel mußte austariert für ungefähr eine Stunde polymerisieren.

Vor dem Auftragen wurden die Pufferkammern mit 0,5 × TBE gefüllt, und das Gel wurde vertikal in die Kammer gestellt. Anschließend wurden 4 µl Gelladepuffer mit 10-20 µl TRAP-Produkt vermischt und aufgetragen. Auf jedes Gel wurde auch 1 µl eines radioaktiv markierten DNA-Größenstandards aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.7). Die Elektrophorese lief so

lange, bis das Bromphenolblau vollständig aus dem Gel gewandert war. Bei 125 V dauerte sie rund 3 Stunden.

Nach dieser Zeit wurden die Platten vorsichtig getrennt, das Gel auf ein Whatman-Papier übertragen und mit Saran[®]-Folie abgedeckt. Das Trocknen des Gels mit Hilfe einer Vakuum-Pumpe dauerte circa eine Stunde.

2.2.7 Kinasierung des DNA-Längenstandards

Um einen hinreichenden Größenvergleich der in der Elektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente zu erhalten, setzt man Längenstandards ein. Diese stammen von Bakterien-DNA, die durch Restriktionsenzyme in definierte Fragmente geschnitten wurde. Für den TRAP-Assay wurde der pBR 322 DNA / *Bsu*RI Marker, 5 verwendet. Damit er bei einer Autoradiographie sichtbar wurde, wurde er - ähnlich wie beim TS-Primer - in einer Kinasierungsreaktion radioaktiv markiert. Den Ansatz zeigt Tabelle 2-13.

DNA-Längenstandard	10 µg
5 × Exchange Puffer	5 µl
[γ - ³³ P]-ATP	5 µl
T ₄ -Polynucleotidkinase	5 U
H ₂ O	ad 25 µl
Gesamt-Volumen	25 µl

Tabelle 2-13: Kinasierungsansatz für DNA-Längenstandard

Dieser Ansatz wurde bei 37°C 30 min in einem Thermocycler inkubiert und dann bei 85°C 5 min denaturiert. Der Ansatz wurde danach in einem Reinigungsschritt von den freien Nucleotiden befreit. Während der Inkubationszeit wurden die Reinigungssäulen vorbereitet. Sie wurden zunächst mit 70 µl 1 × STE überschichtet. Mit einer auf die Säulen passenden Spritze wurde der Puffer durch das gesamte Säulenmaterial gedrückt. Dabei mußte dieses mehrfach mit 70 µl 1 × STE überschichtet werden. Ein Austrocknen der Säule wurde so vermieden. Austretende Tropfen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Wenn der erste Tropfen am Ende der Säule sichtbar wurde, konnte die Probe aufgetragen werden. Diese wurde zunächst mit 45 µl 1 × STE versetzt. Die Probe wurde mit Hilfe einer vollständig aufgezogenen Spritze durch das Säulenmaterial gedrückt. Nun wurden weitere 70 µl 1 × STE auf die Säule gegeben und die nun durch Spritzendruck austretene Lösung in einem frischen Reaktionsgefäß aufgefangen. Hierbei handelte es sich um den aufgereinigten, mit ³³P-gelabelten DNA-Längenstandard. Zum Erzielen einer höheren Ausbeute wurde der Vorgang wiederholt.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst, einen möglichst sensitiven aber verlässlich durchführbaren TRAP-Assay zu etablieren. In diesem Rahmen wurde auch der über die Firma *Oncor Appligene*[®] erhältliche TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit auf seine Nützlichkeit getestet. Weiterhin sollte der dann etablierte TRAP-Assay auf verschiedene Patientenproben angewendet, seine generelle Aussagekraft hinsichtlich Telomerase-Aktivität und seine mögliche Anwendung in der klinischen Routinediagnostik untersucht werden.

3.1 Etablierung und Optimierung des TRAP-Assays

Die Etablierung des TRAP-Assays wurde zunächst mit Proteinextrakten der Tumorzelllinien NCI-H 69 und LCLC-103 H durchgeführt, um später anhand von Extrakten der Patientenproben weiter optimiert zu werden. Diese Optimierung gestaltete sich äußerst schwierig. Im »klassischen TRAP-Assay« konnte Telomeraseaktivität manchmal mit einer Sensitivität von 100 reinen Tumorzellen nachweisen werden (KIM et al. 1994). Die Voraussetzungen dieser Arbeit unterschieden sich sehr von denen des Assays von KIM et al. 1994, weil die untersuchten Patientenproben Tumorzellen nur im Unterschuß enthielten. Sie waren häufig nicht nur sehr zellarm, sondern auch blutig, sehr viskos und proteasehaltig. Dies erforderte vor der eigentlichen Proteinextraktion eine gesonderte Aufarbeitung, wodurch wiederum Verluste von Zellen und Proteinen entstanden. Deswegen galt es, die verschiedenen Teilschritte (siehe Abbildung 2-1) des TRAP-Assays so weit zu sensitivieren, daß sich der Assay als Ganzes für die Messung von Telomeraseaktivität in den Patientenproben eignet. Die Optimierungsschritte werden im folgenden einzeln dargestellt.

3.1.1 Proteinextraktion

3.1.1.1 Optimierung und Durchführung der Proteinextraktion

Alle Patientenproben wurden unter keim- und RNAsen-armen Bedingungen gewonnen und sofort danach auf Eis oder in einem Kühlschrank bei 4°C gelagert. Anfangs wurden die in den Proben enthaltenen Zellen mit Hilfe des Einfriermediums A so präpariert, daß sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten, ohne durch den Einfrier- und Auftauvorgang beschädigt zu werden. Nur von einer Hälfte der Zellen wurden die Proteine extrahiert, damit die andere Hälfte für weitere zytologische Experimente zur Verfügung stand. Bei Vergleich

der Zellzahl in Sputum und Lavagen durch eine Zellzählung vor und nach dem Einfrier- und Auftauvorgang stellte sich aber heraus, daß die Zellzahlen meistens abgenommen hatten (Tabelle 3-1). In der unten abgebildeten Tabelle zeigt lediglich Sputum B eine geringe Verringerung der Zellzahl (4%). Der Anteil an malignen Zellen konnte bei den Zellzählungen der Proben nicht genau festgestellt werden.

Material	Zellzahl frisch in gesamter Probe	Zellzahl nach Einfrieren in flüssigem N ₂ in gesamter Probe	Abnahme
Sputum A	$4,8 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5$	12,5 %
Sputum B	$5,0 \cdot 10^5$	$4,8 \cdot 10^5$	4 %
Lavage A	$1,84 \cdot 10^6$	$1,44 \cdot 10^6$	21,7 %
Lavage B	$1,6 \cdot 10^6$	$1,28 \cdot 10^6$	20 %

Tabelle 3-1: Zellzahl vor und nach Einfrier- und Auftauvorgang im Vergleich

Hierbei wurden bei jeweils zwei Sputen und Lavageproben die Zellzahl in der frischen Probe bestimmt und die Zellen danach in einem Einfriermedium in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach circa einer Woche wurden die Zellen aufgetaut und sofort nach dem Auftauvorgang erneut gezählt. Dabei fiel eine Abnahme der Zellzahl in allen Proben auf.

Weiterhin wurde analysiert, ob das verwendete Einfriermedium die Aktivität der Telomerase beeinträchtigt. Dazu wurden Telomerase-positive Zellen einer genau bestimmten Anzahl mit dem Einfriermedium vermischt und ein TRAP-Assay mit dem daraus hergestellten Proteinextrakt durchgeführt. Es zeigte sich, daß das Einfriermedium selbst Telomeraseaktivität und die Sensitivität des TRAP-Assays nicht beeinflußt (siehe Abbildung 3-1). Zusätzlich wurden zwei TRAP-Assays mit Tumorzellextrakten verglichen, von denen einer aus frischen Zellen definierter Anzahl sofort und der andere aus in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen gleicher Zahl gewonnen wurden. Dabei besaß der Extrakt aus frischen Zellen eine höhere Aktivität an Telomerase. Dies war ersichtlich aus der Anzahl und Stärke der Banden der TRAP-Leiter (Gel nicht gezeigt). Das Phänomen war wahrscheinlich auf die oben erwähnte Zellzahlminderung nach dem Einfrier- und Auftauvorgang

zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde die Proteinextraktion bei den Patientenproben immer sofort nach deren Gewinnung durchgeführt.

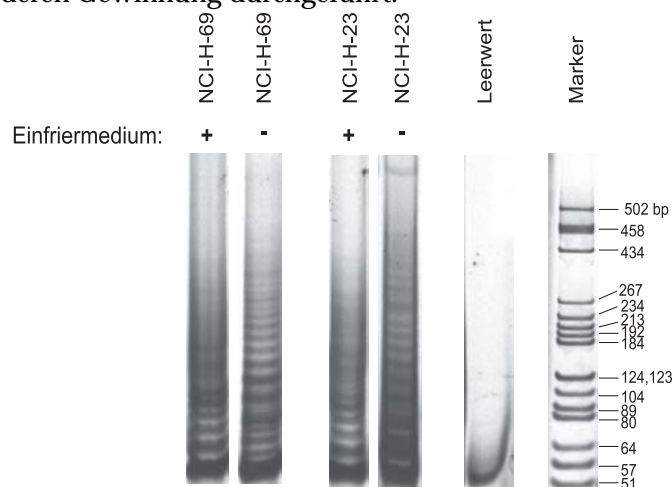


Abbildung 3-1: TRAP-Assays zweier Proteinextrakte aus Zellen mit Einfriermedium

Um festzustellen, ob das verwendete Einfriermedium selbst die Telomeraseaktivität der Proben beeinflusst, wurden Zellextrakte von zwei verschiedenen Tumorzelllinien mit definierter Zellzahl miteinander verglichen. Dabei wurde jeweils eine Probe mit Einfriermedium versetzt. Anschließend wurden von dieser und von der nicht mit Einfriermedium vermischten Probe Proteinextrakte gewonnen und ein TRAP-Assay unter identischen Bedingungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das Einfriermedium keinen Einfluß auf die Telomeraseaktivität und die Sensitivität des TRAP-Assays hatte.

Die Proteinextraktion erfolgte mit einer definierten Menge Lysis Puffer (siehe Kapitel 2) in Anlehnung an das Protokoll des TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit von *Oncor Appligene*[®]. Zusätzlich zu den Hinweisen des Kit-Herstellers wurde bei der in dieser Arbeit vorgestellten Proteinextraktion nicht nur RNase Inhibitor zum Schutz vor ubiquitär vorkommenden RNAsen sondern zusätzlich noch PMSF eingesetzt, um auch die Proteinuntereinheiten der Telomerase vor der Wirkung von Proteasen zu bewahren.

Einige der zu analysierenden Patientenproben bestanden aus sehr zähem Mucus (darunter vor allem Sputum, Lavagen und einige Pleurapunktionen). Ohne Vorbehandlung waren diese Proben dem Lysispuffer nur sehr schwer zugänglich, so daß in diesen Fällen Proteinextrakte sehr schlechter Qualität erzielt wurden (zu ersehen aus geringer Proteinkonzentration, geringer bis keine Aktivität bei der Alkalischen-Phosphatase-Testung). Aus diesem Grund wurde die betreffende Probe vor dem ersten Zentrifugierschritt mit einer halben bis ganzen Ampulle *Acetylcystein* (ACC, 300 mg/Ampulle) versetzt, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert (Wirkmechanismus siehe Kapitel 2), bevor dann die eigentliche Proteinextraktion durchgeführt wurde. Um festzustellen, ob ACC die Telomeraseaktivität beeinträchtigt, wurden verschiedene telomeraseaktive Zelllinien (NCI-H 69 und MCF 7) vor der Proteinextraktion mit ACC versetzt. Nach 15 minütiger Wirkzeit wurde die Proteinextraktion aus einer definierten Zellzahl nach Protokoll angeschlossen und ein TRAP-Assay durchgeführt. Es war kein Unterschied zur Normalkontrolle (gleiche Zellart und Zellzahl

ohne ACC) festzustellen (siehe Abbildung 3-2). Die Verwendung von ACC kann also zur Verbesserung der Proteinextraktion aus besonders zähen Materialien eingesetzt werden, ohne die Enzymaktivität der Telomerase negativ zu beeinflussen.

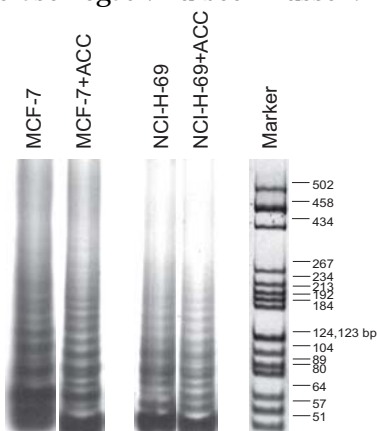


Abbildung 3-2: TRAP-Assays aus Proteinextrakten gleicher Zelllinien mit und ohne ACC

Bei diesem Experiment wurde der Einfluß des ACC auf die Aktivität der Telomerase und auf die Sensitivität des TRAP-Assays überprüft. Dabei wurden von Tumorzellen definierter Anzahl von zwei verschiedenen Zelllinien mit und ohne ACC Proteinextrakte gewonnen und ein TRAP-Assay durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß ACC die Telomeraseaktivität nicht beeinflusste und die Banden des TRAP-Assays sogar deutlicher erscheinen ließen. So kann die Verwendung von ACC bei zähen Materialien die Proteinextraktion verbessern, ohne die Telomeraseaktivität der Proben und die Sensitivität des TRAP-Assays zu vermindern.

Einige der Patientenproben, besonders die Pleura- und Perikardpunktionen, enthielten deutlich sichtbar Erythrozyten. Um eine Hemmung der *Taq*-DNA-Polymerase während der PCR zu verhindern, wurde eine zellschonende Methode entwickelt, das Blut aus dem Zellgemisch zu entfernen. Die dabei verwendeten Lösungen waren RCLB (K. Stegmann, pers. Mitteilung) und eine hypertone Lösung (YAHATA et al. 1998). Der Waschschrift hat keine negativen Auswirkungen auf die Telomeraseaktivität der behandelten Zellen. Dies wurde überprüft, indem verschiedene blutige Patientenproben mit Telomerase-positiven Zellen vermischt, dem Waschschrift mehrmals unterzogen wurden und anschließend eine Proteinextraktion mit nachfolgendem TRAP-Assay durchgeführt wurde (siehe Abbildung 3-3). Dabei wurde - wie auch im Folgenden - ein TRAP-Assay dann als »Telomerase-positiv« gedeutet, wenn mindestens vier Banden im Abstand von 6 bp bei Vergleichbarkeit dieser Banden mit dem Bandenmuster der Positivkontrolle erkennbar waren. Dabei erscheint bei der Positivkontrolle eine stärkere und längere Bandenleiter als bei den Patientenproben, weil bei der Positivkontrolle ein Proteinextrakt aus einer sehr viel größeren Zellzahl eingesetzt wurde. Die Einzelbande im Leerwert war bei allen TRAP-Assays aufgetreten und wurde nicht als Kontamination interpretiert. Bei den Leerwerten wurde statt Proteinextrakt Wasser

eingesetzt, so daß die Bande, die eine Größe von circa 50 bp besitzt, auf eine Artefaktbildung durch die Dimerisierung der beiden Primer zurückzuführen ist.

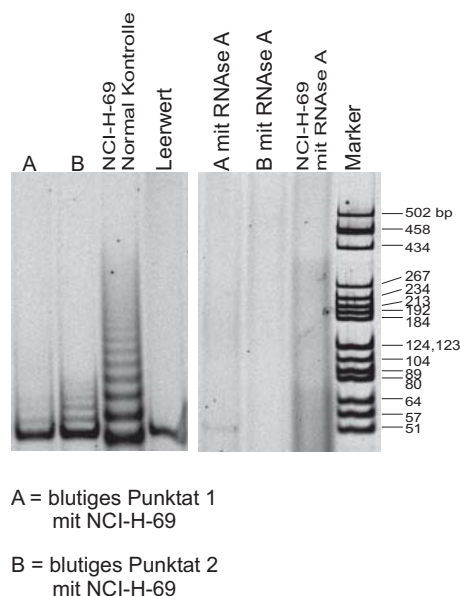


Abbildung 3-3: TRAP-Assays nach Behandlung der Zellen mit RCLB und hypertoner Lösung

Zwei deutlich bluthaltige Patientenproben (eine Pleurapunktion A und eine Aszitespunktion B) wurden mit einer definierten Anzahl Telomerase-positiver Zellen (NCI-H-69) versetzt und anschließend dem Waschschrift mit den beiden oben genannten Lösungen zwei Mal unterzogen. Danach wurden Proteinextrakte aus den Proben gewonnen und ein TRAP-Assay durchgeführt. Mit Hilfe von RCLB und der hypertonen Lösung konnten die Erythrozyten und das Hämoglobin, welches die DNA-*Taq*-Polymerase hemmen soll (ABU AL-SOUD & RADSTROM 1998, AL-SOUD ET AL. 2000), aus den Proben entfernt werden. Dabei wurde die Telomeraseaktivität durch die Verwendung dieser beiden Lösungen nicht gehemmt.

3.1.1.2 Messung eines Referenzenzym

Von Bedeutung für die Qualitätskontrolle der Proteinextraktion war neben der Bestimmung der Proteinkonzentration die Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase (HEINE et al. 1998). Das Enzym kommt in allen Zellen vor und galt als Index für die Enzymaktivität in dem Lysat. Es wurde ein Protokoll entwickelt, welches schnell und einfach durchzuführen war. Die Bestimmung erfolgte über die Messung eines Farbumschlages (siehe Kapitel 2). Zellextrakte ohne Alkalische Phosphatase Aktivität wurden trotzdem mit dem TRAP-Assay auf Telomeraseaktivität überprüft, doch zeigte keiner dieser Extrakte ein positives Ergebnis.

3.1.2 Optimierung des TRAP-Assays

3.1.2.1 Detektionsmethoden

Zunächst wurde die Telomeraseaktivität über Verwendung des TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit bestimmt. Um verschiedene Alternativen zur Visualisierung zu vergleichen und

auf ihre Sensitivität zu überprüfen, wurde sich bei der Versuchsdurchführung strikt an das vorgegebene Protokoll gehalten. Die Verwendung von ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen verschiedener Konzentration schlug fehl, so daß auf den Einsatz von aufwendiger herzustellenden Polyacrylamidgelen zurückgegriffen werden mußte. Um das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen und die damit verbundenen Gefahren zu umgehen, wurde das Gel zunächst in einem Ethidiumbromid-Färbebad circa 15 min inkubiert, um so die DNA unter UV-Licht zu visualisieren. Die DNA-»Leitern«, die das Produkt des TRAP-Assays sind, waren nur schlecht zu sehen, so daß auch diese Methode nicht zufriedenstellend war. Aus diesem Grund wurde die Detektion mit Radioaktivität vorgezogen. Bei Durchführung eines TRAP-Assays mit radioaktiven Nucleotiden gibt es zwei Möglichkeiten: entweder man verwendet ein radioaktives Desoxynucleotid, welches bei der PCR mit den nichtradioaktiven dNTPs um den Einbau in die neu synthetisierten Stränge konkurriert, oder man markiert einen der PCR Primers in einer vorangestellten Kinasierungsreaktion radioaktiv. Die als erstes genannte Möglichkeit ist weniger aufwendig und spart Kosten. Aus diesem Grund wurde der TRAP-Assay Ansatz zunächst mit radioaktivem [$\alpha^{33}\text{P}$]-dCTP versetzt, doch der Versuch schlug fehl. Der Grund könnte einmal darin liegen, daß dCTP von Telomerase nicht an den TS-Primer transkribiert wird. Deshalb kann der Einbau von [$\alpha^{33}\text{P}$]-dCTP nur bei der Polymerisation des Tochterstranges durch die *Taq*-DNA-Polymerase während der PCR stattfinden. Aufgrund der Konzentrationsverhältnisse ist offenbar der tatsächliche Einbau von [$\alpha^{33}\text{P}$]-dCTP zu gering, um gute Ergebnisse zu erzielen.

Also wurde dazu übergegangen, das TS-Oligonucleotid über eine Kinasierungsreaktion mit [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP radioaktiv zu markieren. Dadurch wurde garantiert, daß alle amplifizierten DNA-Stücke radioaktiv markiert waren und so eine sensitive Detektion stattfand.

Hinsichtlich der Zusammensetzung eines Kinasierungsansatz gibt es zahlreiche Möglichkeiten. Um den optimalen Ansatz für den TRAP-Assay in dieser Arbeit herauszufinden, wurden drei verschiedene Kinasierungsreaktionen miteinander verglichen. Der erste Kinasierungsansatz entspricht der Vorgabe von *Oncor Appligene*[®] bei dem *TRAPEZE*[®] Telomerase Detection Kit, der zweite wurde einer Publikation entnommen (KIM & WU 1997), der dritte stammt aus eigenen Überlegungen (M. Kersting, pers. Mitteilung). Dabei zeigte der eigene 15 µl-Kinasierungsansatz (siehe Kapitel 2) die besten Ergebnisse, so daß ab nun alle TRAP-Assays mit dem über diesen Reaktionsansatz kinasierten TS-Primer durchgeführt wurden.

Üblicherweise folgt der Primerkinasierung eine Aufreinigung des Primers über Sephadex-650-Säulen, um ihn von freien radioaktiven Nucleotiden zu trennen. Darauf wurde in dieser

Arbeit verzichtet, nachdem eine Reinigung zunächst mit Hilfe eines *QiaQuick Nucleotide Removal Kits*[®] versucht worden war. Aufgrund der relativ kurzen Länge des Oligonucleotids TS (18 Basen) war eine zu große Menge des Primers an die *QiaQuick*-Säulen adsorbiert worden, woraus ein hoher Verlust des Oligonucleotids resultierte. Die Konzentration des Primers im Eluat und damit die eingesetzte Reaktionsmenge war hier zu gering. Als Folge hiervon ergab sich nur eine unzufriedenstellende Detektion der Banden.

3.1.2.2 Primer und TRAP-Puffer

Obwohl der TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit mit Tumorzellen positive Ergebnisse zeigte, bestand bei der Verwendung dieses Kits trotz strengster Beachtung der Herstellerhinweise zur Vermeidung einer DNA-Veschleppung eine hohe Kontaminationsgefahr. Das Protokoll des Kits sah die Verwendung eines TSR8-Templates zur Semi-Quantifizierung der Telomeraseaktivität vor. Es handelte sich um ein Oligonucleotid mit gleicher Sequenz wie der TS-Primer zusätzlich verlängert durch acht telomerische Repeats. Pro Ansatz wurden 0,1 aMol (10^{-19} Mol) verwendet. Obwohl immer Handschuhe getragen wurden, nur mit Filtertips zur Vermeidung von Aerosolbildung gearbeitet wurde, alle PCR-Trays und Pipetten immer mit 10%iger Bleiche von DNA befreit wurde und eine strikte räumliche Trennung zwischen PCR-Arbeitsplatz und Gelladeplatz eingehalten wurde, reichte diese geringe Menge trotzdem regelmäßig aus, die Aliquots der Primer und dNTPs zu kontaminieren (siehe Abbildung 3-4). Dadurch konnte das gesamte Kit nicht mehr verwendet werden, weil die Komponenten nicht einzeln zu erwerben sind.

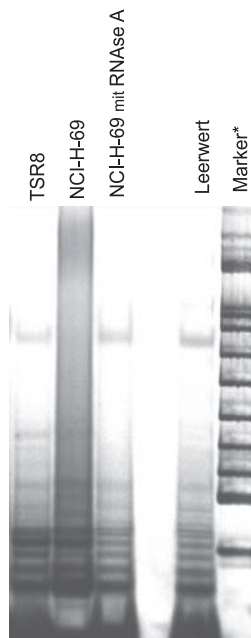


Abbildung 3-4: Kontaminierter TRAP-Assay durchgeführt mit Hilfe des TRAPEZE® Telomerase Detection Kit von Oncor®

Mit telomerasepositiven Zellen wurde mit diesem Kit ein TRAP-Assay nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde auch das TSR8-Template zur Semiquantifizierung in einer Menge von 0,1 aMol pro Ansatz verwendet. Es handelt sich hierbei um ein um acht telomerische Repeats verlängertes TS-Oligonucleotid. Diese geringe Menge reichte trotz sauberster Arbeitsweise aus, eine dauerhafte Kontamination aller Proben und des Leerwertes zu verursachen. In der Abbildung ist dies an den Banden im Leerwert erkennbar, die den Banden der Proben entsprechen.

Aus diesem Grund wurde auf das Kit verzichtet und der Assay mit eigenen Primern etabliert. Dabei wurde als Reverseprimer nicht der CX Primer wie beim »klassischen TRAP-Assay« (KIM et al.1994) gewählt. Es ist bekannt, daß bei der Verwendung von TS und CX als Primerkombination häufig eine Dimerisierung stattfindet, die wiederum die gestaffelte Primeranlagerung (»*Staggered Annealing*«) erleichtert (KIM et al. 1994, KRUPP et al. 1997) (siehe Kapitel 4 und Abbildung 4-1). Deshalb wurde als *reverse*-Primer ACX eingesetzt, der einen 6-Basen langen Anker trägt (KRUPP et al. 1997).

Gleichzeitig wurden zunächst bei jedem TRAP-Ansatz zwei weitere Oligonucleotide eingesetzt. Eines (TSNT) diente als interne Kontrolle und wurde bei der PCR mit Hilfe des Primers TS und des anderen Oligonucleotids NT amplifiziert. So wurde ein zusätzliches Produkt von 36 bp erzeugt, dessen Amplifikation die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren bei

nicht vorhandener »TRAP-Leiter« ausschloß. Der Zusatz einer internen Kontrolle ermöglichte gleichzeitig einer Semiquantifizierung der Produkte.

Um auch einen geeigneten Puffer unabhängig des Telomerase-Kits einsetzen zu können, wurde ein eigener Puffer (KIM et al. 1994) in 10facher Konzentration angesetzt (siehe Material und Methoden). Er bot der Telomerase und gleichzeitig auch der *Taq*-DNA-Polymerase optimale Reaktionsbedingungen.

3.1.2.3 PCR

Mit der Verwendung der eigenen Oligonucleotide und des eigenen Puffers wurden auch die PCR-Bedingungen optimiert. So wurde über die Durchführung einer einfachen PCR mit TS und NT als Primer und TSNT als Template verschieden *Taq*-DNA-Polymerasen und PCR-Puffer getestet. Gleichzeitig wurde überprüft, ob und für welche *Taq*-DNA-Polymerasen sich der selbst hergestellte TRAP-Puffer am besten eignet (siehe Tabelle 3-1).

<i>Taq</i>-DNA-Polymerase	Puffer	Zusatzlösung^a	Ergebnis
Qiagen [®]	TRAP		++
Qiagen [®]	TRAP	Lösung Q	-
Boehringer Mannheim [®]	TRAP		+
Perkin Elmer [®]	TRAP		-
Perkin Elmer [®]	TRAP		+
AmpliGoldTaq [®]	TRAP		+
Qiagen [®]	Qiagen		++
Qiagen [®]	Qiagen	Lösung Q	+

Tabelle 3-2: Vergleich verschiedener *Taq*-DNA-Polymerasen und Puffer

Es zeigte sich bei diesem Experiment, daß mit der grau unterlegten Kombination an *Taq*-DNA-Polymerase und TRAP-Puffer ohne Lösung Q die besten Ergebnisse erzielt werden konnten.

a. Lösung Q ist eine von der Firma Qiagen hergestellte detergenzhaltige PCR-Zusatzlösung, die die PCR-Bedingungen bei Einsatz von besonders G-C-reichen Primern verbessern soll

Unter Beachtung der oben dargestellten Ergebnisse wurde ab nun *Qiagen*[®] *Taq*-DNA-Polymerase zusammen mit dem eigenen TRAP-Puffer ohne Lösung Q eingesetzt.

Die PCR-Bedingungen wurden in weiteren Experimenten hinsichtlich der Temperatur und Dauer des Telomeraseextensionsschrittes, der Annealingtemperatur und der Zyklenzahl und -dauer variiert. Den optimalen Temperaturverlauf entnehme man Kapitel 2.

Es wurden ebenfalls zwei verschiedene PCR-Thermocycler getestet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß mit dem Thermocycler 2400[®] von *Perkin Elmer*[®] entschieden bessere Ergebnisse als mit dem PCR-Cycler *Gene E*[®] von *Techne*[®] erzielt werden konnten, so daß der TRAP-Assay nur noch auf dem ersteren Gerät durchgeführt wurde. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei den TRAP-Assays ist zum einen auf die schnelleren Heiz- und Kühlgeschwindigkeiten und zum anderen auf die möglicherweise höhere Temperaturgenauigkeit des *Perkin Elmer*[®] Gerätes zurückzuführen

Mit den eigenen Primern und den beschriebenen Optimierungen konnten mit Extrakten aus Tumorzelllinien zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden. Eine absteigende Konzentrationsreihe ergab eine meßbare Telomeraseaktivität bis hinab zu Mengen, die 50 bis 100 malignen Zellen entsprachen (Verdünnungsreihe nicht gezeigt).

Ein wichtiges Ziel war nun, diese Nachweisgrenze so weit wie möglich zu senken, damit auch eine sehr geringe Anzahl an Tumorzellen in manchen Patientenproben noch detektiert werden konnten. Dies wurde durch den Verzicht auf die interne Kontrolle erreicht. Durch diese Modifikation mußte die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren in einer zweiten PCR überprüft werden, jedoch konnte dadurch eine deutliche Steigerung der Sensitivität des TRAP-Assays erreicht werden. Die Nachweisgrenze lag nun bei circa 10 Zellen.

Zellzahl NCI-H-69:

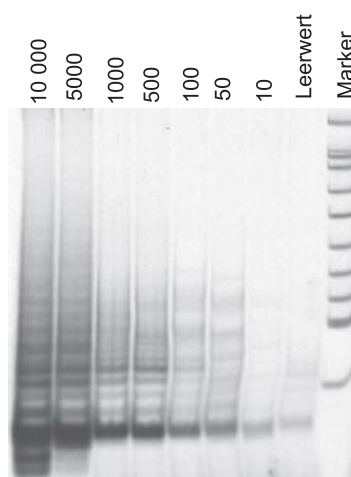


Abbildung 3-5: Verdünnungsreihe mit NCI-H-69 (ohne Wachschicht und ohne interner Kontrolle)

Durch das Fortlassen der internen Kontrolle konnte die Nachweisgrenze des TRAP-Assays von circa 50-100 Tumorzellen (entspricht der Verwendung der internen Kontrolle) auf circa 10 Zellen gesenkt werden. Hierdurch konnte die Sensitivität des TRAP-Assays gesteigert werden. Trotzdem tauchten im Leerwert regelmäßig leiterähnliche Banden auf, die eine eigentliche Interpretation der Versuchsergebnisse erschwerten.

Ein Problem bestand darin, daß bei der Anwendung des so etablierten TRAP-Assays auf Proteinextrakte aus Patientenproben sowohl in den Proben selbst als auch im Leerwert leiterähnliche Banden unklarer Entstehungsweise detektiert werden konnten. Sie ließen sich durch Zugabe von RNase A nicht aufheben. Eine Interpretation des Assays war dadurch deutlich erschwert (siehe Abbildung 3-8).

Es wurde überprüft, ob es sich bei diesen Banden um Kontaminationen handeln könnte. Dazu wurde eine Versuchsreihe mit neuen Aliquots von Primern, dNTP, Wasser und *Taq*-DNA-Polymerase in folgenden Ansätzen durchgeführt:

- PCR (28 Zyklen) mit ^{33}P -TS und ACX ohne Template
- PCR (28 Zyklen) mit ^{33}P -TS ohne ACX, ohne Template
- PCR (28 Zyklen) mit ^{33}P -ACX ohne TS, ohne Template
- ^{33}P -TS auf das Gel aufgetragen ohne PCR
- ^{33}P -ACX auf das Gel aufgetragen ohne PCR
- ^{33}P -TS und ACX auf das Gel aufgetragen ohne PCR

Dabei zeigten sich die Banden nur im ersten Ansatz, in dem beide Primer gemeinsam einer PCR unterzogen wurden (Gel nicht gezeigt). Bei den Banden mußte es sich also um Primer-Dimere mit zusätzlichen Artefakten ähnlich des »*Staggered Annealings*« handeln.

Eine interessante Erkenntnis ergab sich aus der Beobachtung, daß diese Banden zwar nicht vollständig vermieden aber verringert werden konnten, indem nur solche dNTP-Aliquots verwendet wurden, die nicht öfter als fünfmal aufgetaut und eingefroren wurden.

In einem nachfolgenden Experiment versuchte man nun, diese PCR-Artefakte endgültig zu entfernen. Dazu wurden die Primer durch eine Wachsschicht während des Telomeraseextensionsschrittes räumlich voneinander getrennt (KIM et al. 1994). Tatsächlich konnte durch die Wachsschicht das Artefaktproblem gelöst werden. Weder in den Leerwerten noch in definitiv telomerasenegativen Proteinextrakten konnten die vorher vorhandenen

»TRAP-Leiter« ähnlichen Banden entdeckt werden. Eine Anwesenheit von PCR-Inhibitoren konnte durch eine zweite PCR mit interner Kontrolle ausgeschlossen werden.

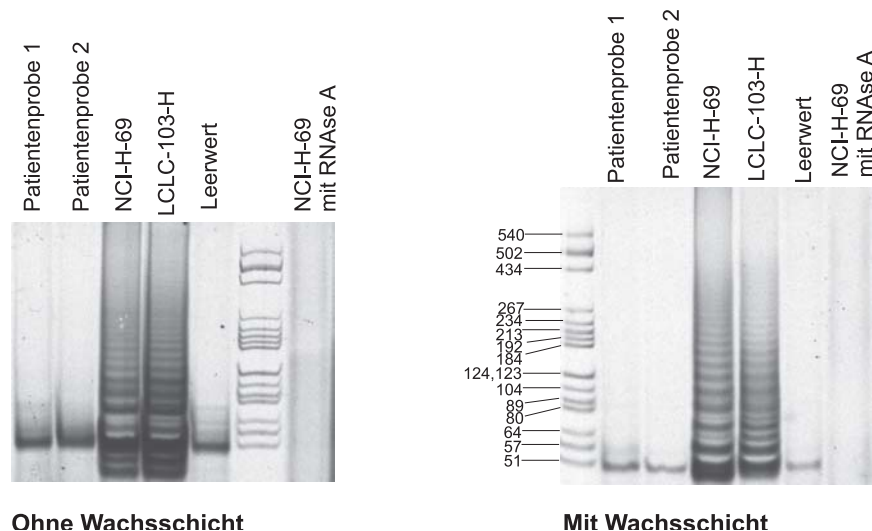


Abbildung 3-6: Vergleich zweier TRAP-Assays der gleichen Probe mit und ohne Wachsschicht
Durch die räumliche Trennung der TRAP-Assay Reagenzien während des Telomeraseextensionsschrittes (siehe auch das Kapitel Material & Methoden) konnten die Banden im Leerwert und in telomerasenegativen Proben eliminiert werden, die beim TRAP-Assay ohne Wachsschicht eine Interpretation der Proben verhinderten. Außerdem fand eine saubere Darstellung der »TRAP-Leiter« bei telomerasepositiven Proben statt. Die einzelne Bande im Leerwert und in den Proben wurde weiterhin sichtbar und ist auf eine Primerdimerisierung zurückzuführen.

Parallel wurde erneut eine Verdünnungsreihe mit einem Telomerase-positiven Extrakt aus einer definierten Zellzahl angefertigt, um eine Auskunft über die Sensitivität der abgeänderten Methode zu erhalten. Dabei stellte sich heraus, daß wie zuvor ein Nachweis von bis zu circa 10 Tumorzellen möglich war. Ein weitere Verdünnungsreihe mit einem Gemisch aus dem gleichen Tumorzell-extrakt und Sputumextrakt ergab ebenfalls diese Nachweisgrenze.

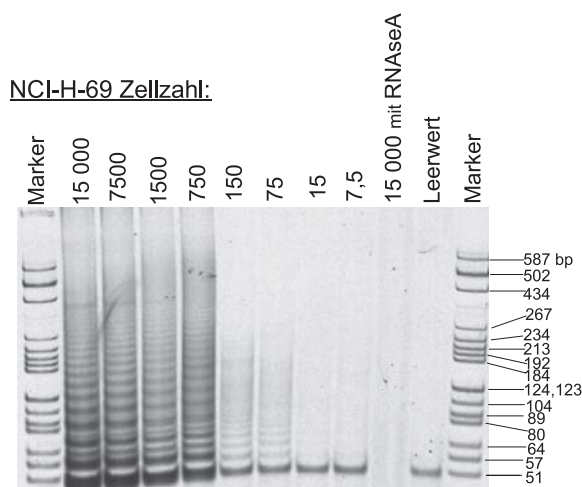


Abbildung 3-7: Verdünnungsreihe mit Wachsschicht

Bei Verwendung der Wachsschicht lag auch hier die Nachweisgrenze bei circa 10 Tumorzellen. Allerdings war nun der Leerwert nicht mit leiterähnlichen Banden kontaminiert, so daß nun eine valide Interpretation der Ergebnisse

möglich war.

3.1.2.4 Elektrophorese

Im Rahmen der Optimierung der verschiedenen Teilschritte des TRAP-Assays wurden auch die Bedingungen der Elektrophorese verändert. Um eine möglichst gute Auflösung der TRAP-Banden zu erhalten, sollten immer Polyacrylamidgele in einer Konzentration von mindestens 12 % angefertigt werden. Von entscheidender Bedeutung stellte sich die Verwendung eines geeigneten Gelladepuffers heraus. Es wurden insgesamt neun verschiedene Auftragspuffer in einem Experiment blind, das heißt ohne vorherige Kenntnis der genauen Zusammensetzung, getestet. Man entschied sich für einen Auftragspuffer (in der unteren Abbildung Nummer 2), der die Bandenqualität stark verbessern konnte und nannte ihn »Gelladepuffer I«. Er war zu 95% formamidhaltig.

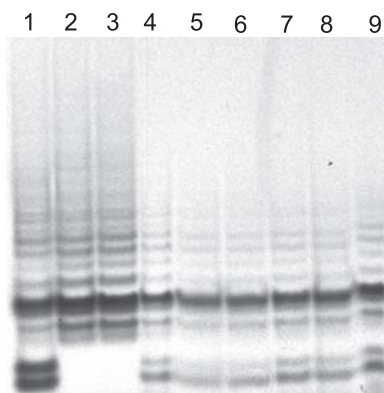


Abbildung 3-8: Bandenqualitäten verschiedener Auftragspuffer

Es wurden verschiedene Auftragspuffer ohne vorherige Kenntnis der Zusammensetzung getestet, um eine optimale Darstellung der Banden auf den Gelen zu erreichen. Man hat sich aufgrund der besten Bandendarstellung für Auftragspuffer Nummer 2 entschieden und nannte ihn »Gelladepuffer I«.

Die Elektrophorese besitzt eine optimale Laufdauer von circa 3 Stunden bei einer Spannung von 125 bis 130 V (*Feldstärke=V/m). Eine kürzere Laufzeit sowie eine von circa 125 V abweichende Spannung führt zu unsauber getrennten Banden und somit zu einer unscharfen »TRAP-Leiter«.

3.2 Ergebnisse der Patientenproben

Alle Proteinextrakte der Patientenproben wurden mit dem optimierten TRAP-Assay mehrfach auf Telomeraseaktivität überprüft. Jede Extraktion und jeder TRAP-Assay wurde ohne Kenntnis der Diagnose durchgeführt. Nach der vollständigen Testung aller Proben auf Telomeraseaktivität wurden die Ergebnisse mit den pathologischen und - falls vorhanden - zytologischen Befunden verglichen. Darüberhinaus wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt.

3.2.1 Sputen und Lavageproben aus der Bronchoskopie

Bezeichnung ^a	Befund des Zentrums für Pathologie Philipps-Universität Marburg			AP ^b - Aktivität	Telo- merase
	Lungen tumor	Histologie	Zytologie		
S 001 L 001	ja	kleinzelliges Karzinom vom Oat- Cell Typ	positiv	- +	- +
S 002 L 002	ja	nicht-kleinzelliges Karzinom G4 rechter OL	negativ	+ +	+ +
S 003 L 003	ja	großzelliges, z.T. lymphangisches Karzinom G4 rechter OL und ML	nicht bekannt	+ +	+ -
S 004 L 004	nein	geringgradige chron. Entzündung, tumorfrei bei Z.n. Adenokarzinom rechts	nicht bekannt	+ +	- -
S 005 L 005	ja	Plattenepithelkarzinom G3 linker UL	positiv	+ (+) ^c (blutig)	- +
S 006 L 006	ja	Plattenepithelkarzinom G2, z.T. verhornend rechts zentral	zweifelhaft	- -	- -
S 007 L 007	nicht bekannt	ohne pathologischen Befund	nicht bekannt	+ -	+ -
S 008 L 008	nein.	leichte chron. Bronchitis mit Schleimhautfibrose	negativ	- +	- -
S 009 L 009	nein	unauffällige Bronchialschleimhaut	nicht bekannt	- +	+ -

Tabelle3-1: Ergebnisse der Sputen und Lavageproben aus der Bronchoskopie

Bezeichnung ^a	Befund des Zentrums für Pathologie Philipps-Universität Marburg			AP ^b - Aktivität	Telo- merase
	Lungen tumor	Histologie	Zytologie		
S 010		PE aus Bronchoskopie:		+	-
L 010	ja	geringgradige Bronchitis		+	-
	(Diagnose nicht über Bronchosk- opie)	PE über eine Stanzbiopsie: mäßig differenziertes verhorntes Platten- epithelkarzinom G2 paramediastinal links	nicht bekannt		
S 011				+	-
L 011	nein	unspezifische Alveolitis	negativ	+	-
S 012		geringgradige chron. Entzündung,		-	-
L 012	nein	tumorfrei bei Z.n. Adenokarzinom rechts	nicht bekannt	-	-
S 013		Adenokarzinom G2 rechter OL und		+	-
L 013	ja	ML mit Lymphangiosis carcinomatosa	nicht bekannt	+	-
S 014				+	-
L 014	nein	diskrete Bronchitis OL beidseits	nicht bekannt	+	-
S 015				+	-
L 015	nein	chronische Bronchitis	nicht bekannt	+	-
S 016		leichte floride Bronchitis mit begin- nender Metaplasie rechter OL und ML		-	-
L 016	nein		nicht bekannt	+	-
S 017				+	-
L 017	nein	Pneumonie rechter Unterlappen	nicht bekannt	+	-
S 018		chronische Bronchitis mit		+	-
L 018	nein	muzinöser Metaplasie	nicht bekannt	+	-
S 019				-	-
L 019	nein	chronische Bronchitis	nicht bekannt	+	-
S 020		chronische Bronchitis mit fokal		+	-
L 020	nein	unreifer Metaplasie OL beidseits	nicht bekannt	+	-
S 021		leichte chronische Bronchitis linker		+	-
L 021	nein	OL und UL	nicht bekannt	+	-
S 022		leichte Bronchitis		+	-
L 022	nein	Z.n. Adenokarzinom Metastasen im Gehirn bei unbekanntem Primärtumor	nicht bekannt	+	-

Tabelle3-1: Ergebnisse der Sputen und Lavageproben aus der Bronchoskopie

Bezeichnung ^a	Befund des Zentrums für Pathologie Philipps-Universität Marburg			AP ^b - Aktivität	Telo- merase
	Lungen tumor	Histologie	Zytologie		
S 023 L 023	ja	Adenokarzinom G3 rechter UL	nicht bekannt	+ +	+ -
S 024 L 024	nein	chronische Bronchitis mit Meta- plasien rechter OL und UL	nicht bekannt	+ +	- -
S 025 L 025	nein	geringgradige chronische Bronchitis rechter UL	nicht bekannt	+ +	- -
S 026 L 026	nein, aber	leichte chronische Bronchitis linker OL		+ +	- +
	Lymph- knotenme- tastase	Adenokarzinommetastase G3 retro- peritonealer Lymphknoten bei unbekannten Primärtumor	nicht bekannt		
S 027 L 027	nein	leichte chron. Bronchitis mit Schleimhautfibrose	negativ	+ +	- -
S 028 L 028	nein	chronische Bronchitis mit Plattenepithelmetaplasie	nicht bekannt	+ -	- -
S 029 L 029	nein	leichte chronische Bronchitis mit Hinweis auf Plattenepithelmetaplasie	negativ	+ +	- -
S 030 L 030	nein	chronische Bronchitis	nicht bekannt	+ +	- -
S 031 L 031	nein	geringgradige chronische Bronchitis	nicht bekannt	+ +	- -
S 032 L 032	nein	COPD	nicht bekannt	+ +	- -
S 033 L 033	nein	geringgradige chronische Bronchi- tis mit einfacher Epithelhyperplasie	nicht bekannt	+ +	- -

Tabelle3-1: Ergebnisse der Sputen und Lavageproben aus der Bronchoskopie

- a. S = Sputum, L = Lavage
b. AP = Alkalische Phosphatase
c. Aufgrund der blutigen Verfärbung der Probe konnte mit dem auf Absorptionsmessung basierenden Assay zur Messung der Alkalischen Phosphatase Aktivität keine Aussage über die Aktivität dieses Enzyms getroffen werden.

	Telomerase-positiv ^a	Telomerase-negativ	Gesamt
Tumor oder Lymphknotenmetastase (pathologisch gesichert ^b)	6	2	8
kein Tumor (pathologisch gesichert)	1	22	23
pathologischer Befund unbekannt	1	0	1
nicht verwertbare Proben (fehlende Alkalische Phosphatase-Aktivität)	-	-	1

Tabelle 3-3: Vierfeldertafel zu den TRAP-Ergebnissen der Sputen und Lavageproben aus der Bronchoskopie

- a. Telomerase-positiv wurde ein Patient gedeutet, wenn entweder Sputum und/oder Lavage eine TRAP-Leiter mit vier Banden in einem Abstand von 6 bp und gleichem Bandenmuster wie die Positivkontrolle ergaben
- b. pathologischer Befund durch das Zentrum für Pathologie der Philipps-Universität Marburg

Bei der Interpretation der Ergebnisse der bronchoskopisch gewonnenen Sputen und Lavagen wurde ein Patient als Telomerase-positiv gedeutet, wenn entweder Sputum und/oder Lavage eine TRAP-Leiter mit vier Banden in einem Abstand von 6 bp und gleichem Bandenmuster wie die Positivkontrolle ergeben hatte. Dabei wurden Bronchoskopieproben von insgesamt neun Patienten mit einem pathologisch gesicherten Tumor oder einer Lymphknotenmetastase bei unbekannten Primärtumor getestet. Davon waren sechs Patienten Telomerase-positiv, ein Patient (S006 / L006) der neun mit Malignität konnte nicht verwertet werden, weil beide Proben keine Alkalische Phosphataseaktivität aufwiesen. Somit konnte in diesen Proben generell keine Enzymaktivität erwartet werden. Ein weiterer Patient wurde nicht über die bronchoskopisch gewonnen Biopsien, sondern über eine separate Stanzbiopsie als tumortragender Patient diagnostiziert (S010 / L010). Der Anteil Telomerase-positiver Proben an den Proben, die erstens von bronchoskopisch diagnostizierten Tumorpatienten stammten und zweitens eine allgemeine Enzymaktivität im Proteinextrakt aufwiesen, betrug 83,3 % (5 von 6). Gleichzeitig zeigten zwei Proben von Patienten ohne nachgewiesenen Tumor Telomeraseaktivität (siehe hierzu Kapitel 4). Umgekehrt konnte bei 22 von 23 Patienten ohne

Tumor keine Telomeraseaktivität detektiert werden. Die Testung der Telomeraseaktivität stimmte so bei den Nicht-Tumorpatienten zu 95,6% mit dem pathologischen Befund überein.

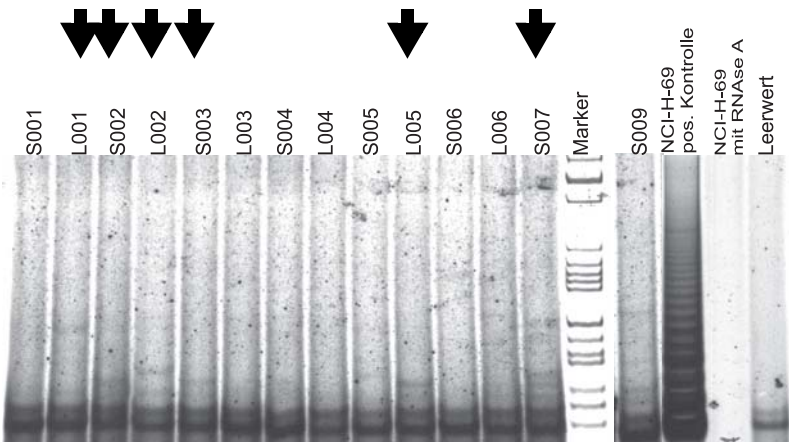


Abbildung 3-9: »TRAP-Leitern« einiger positiver bei der Bronchoskopie gewonnenen Proben
Alle Sputen und Lavageproben wurden mehrfach auf Telomeraseaktivität mit Hilfe des optimierten TRAP-Assays getestet. In der Abbildung wurde TRAP-Ergebnisse einer Auswahl an Proben dargestellt. Die Pfeile indizieren dabei positive Ergebnisse des TRAP-Assays.

3.2.2 Sputen von Patienten auf Station

Bezeichnung	Grunderkrankung	AP ^a -Aktivität	Telo- merase
St S001	Adenokarzinom Lunge	+	-
St S002	Bronchialkarzinom	+	-
St S003	Bronchialkarzinom	+	-
St S004	Bronchialkarzinom	+	-
St S005	Bronchialkarzinom	-	-

Tabelle 3-4: Ergebnisse der Stationsproben
Trotz mehrfacher Durchführung des TRAP-Assays mit allen Sputen konnte bei keiner Probe eine Aktivität der Telomerase festgestellt werden.
a. AP = Alkalische Phosphatase

Bei diesen Patientenproben konnte keine Aktivität der Telomerase nachgewiesen werden. Dabei wurden alle Proben fünffach mit dem optimierten TRAP-Assay getestet. Bei keiner der Proben konnte zu keinem Zeitpunkt eine Telomeraseaktivität festgestellt werden.

3.2.3 Pleurapunktionen

Bezeichnung	Grunderkrankung	zytologischer Befund der Pleuropunktion ^a	AP ^b -Aktivität	Telomerase
P 1	Mammakarzinom	nicht bekannt	+	-
P 2	Adenokarzinom vom Siegelringtyp Pleura	hochgradig verdächtig auf Tumorzellen, eher einem undifferenzierten Karzinom entsprechend	+	-
P 3	nicht bekannt	hämatogener Erguß, überwiegend Lymphozyten, keine Tumorzellen	+	-
P 4	Pneumonie	Granulozyten, zur infektiösen Genese passend, keine Tumorzellen	+	-
P 5	Mammakarzinom	zytologisch verdächtige Zellen	+	+
P 6	Z.n. Mammakarzinom vor 6 Jahren	atypische Zellverbände mit V.a. Tumorzellen, zytol. verdächtig	+	+
P 7	Adenokarzinom Lunge, mäßiggradig differenziert	maligner Zellanteil	+	+

Tabelle 3-5: Ergebnisse der Pleurapunktionen

a. Befunde des Zentrums für Pathologie und Zentrums Innere Medizin Abt. Hämatologie/Onkologie der Philipps-Universität Marburg

b. AP = Alkalische Phosphatase

	Telomerase-positiv ^a	Telomerase-negativ	Gesamt
Tumorzellen in Punktions-probe (zytologisch gesichert ^b)	3	1	4
keine Tumorzellen (zytologisch gesichert)	0	2	2
zytologischer Befund unbekannt	0	1	1

Tabelle 3-6: Vierfeldertafel zu den TRAP-Ergebnissen der Pleurapunktionen

a. Telomerase-positiv wurde ein Patient gedeutet, wenn entweder Sputum und/oder Lavage eine TRAP-Leiter mit vier Banden in einem Abstand von 6 bp und gleichem Bandenmuster wie die Positivkontrolle ergaben

b. zytologischer Befund durch das Zentrum für Pathologie und das Zentrum Innere Medizin Abt. Hämatologie/Onkologie der Philipps-Universität Marburg

Die Ergebnisse des TRAP-Assays bestätigte bei den Pleurapunktionen in fünf von sechs Fällen (83,3 %) den zytologischen Befund. Bei P 1 war kein zytologischer Befund bekannt. Es deutet sich an, daß sich die Pleurapunktate gut für die Untersuchung auf Telomeraseaktivität mit Hilfe des TRAP-Assays eignen (Abbildung siehe folgende Seite). Trotzdem muß für eine verlässlichere Aussage eine größere Probenzahl gesammelt und getestet werden.

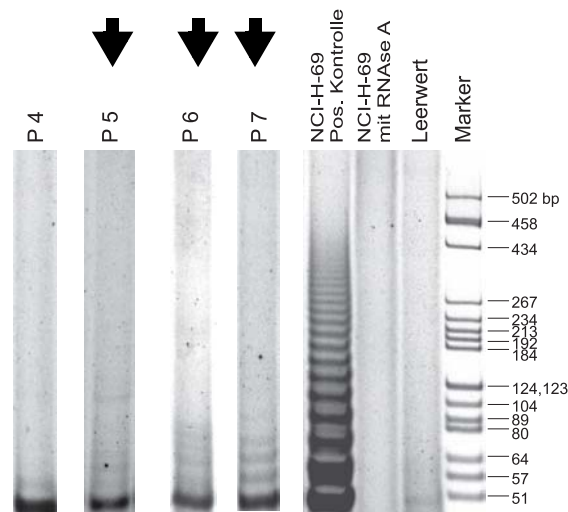


Abbildung 3-10: Gele von positiven Pleurapunktionen

Wie bei allen Proben wurden auch hier alle Pleurapunktionen mehrfach mit Hilfe des TRAP-Assays auf Telomeraseaktivität überprüft. In der obigen Abbildung sind die Gele einiger Proben dargestellt. Die Pfeile indizieren dabei Telomeraseaktivität.

3.2.4 Aszitespunktionen

Bezeichnung	Grunderkrankung	zytologischer Befund ^a	AP ^b -Aktivität	Telomerase
A 1	Pankreaskopfkarzinom m. Peritonealkarzinose	nicht bekannt	+	-
A 2	Pankreaskopfkarzinom m. Peritonealkarzinose	nicht bekannt	+	+
A 3	Pankreaskopfkarzinom m. Peritonealkarzinose	nicht bekannt	+	+
A 4	Kolonkarzinom	nicht bekannt	(+) ^c (blutig)	+
A 5	NHL / CLL	nicht bekannt	(+) (blutig)	+
A 6	NHL / CLL	nicht bekannt	+	-

Tabelle 3-7: Ergebnisse der Aszitespunktionen,

- a. Befunde durch das Zentrum für Pathologie und Zentrum Innere Medizin Abt. Hämatologie/Onkologie der Philipps-Universität Marburg
- b. AP = Alkalische Phosphatase
- c. Aufgrund der blutigen Verfärbung der Probe konnte mit dem auf Absorptionsmessung basierenden Assay zur Messung der Alkalischen Phosphatase Aktivität keine Aussage über die Aktivität dieses Enzyms getroffen werden.

	Telomerase-positiv ^a	Telomerase-negativ	Gesamt
Tumor als Grunderkrankung (zytologische Befunde der Punktionssproben nicht bekannt)	4	2	6
kein Tumor als Grunderkrankung	0	0	0

Tabelle 3-8: Vierfeldertafel zu den TRAP-Ergebnissen der Aszitespunktionen

- a. Telomerase-positiv wurde ein Patient gedeutet, wenn entweder Sputum und/oder Lavage eine TRAP-Leiter mit vier Banden in einem Abstand von 6 bp und gleichem Bandenmuster wie die Positivkontrolle ergaben

Sämtliche während dieser Arbeit untersuchten Aszitespunktionen stammten von Tumorpunkten. Dabei konnte trotz vieler Bemühungen nicht herausgefunden werden, ob von diesen Proben zytologische Untersuchungen durchgeführt wurden und welche zytologischen Befunde dabei erhoben wurden. Bei der Untersuchung auf Telomeraseaktivität konnten bei vier von sechs Proteinextrakten (66,7 %) eine Aktivität der Telomerase festgestellt werden. Wie bereits erwähnt hat keine zusätzliche Probengewinnung für diese Arbeit stattgefunden. Es wurden keine Punktionsproben von Patienten ohne malignen Tumor untersucht, weil im Untersuchungszeitraum keine solchen Patienten punktiert wurden.

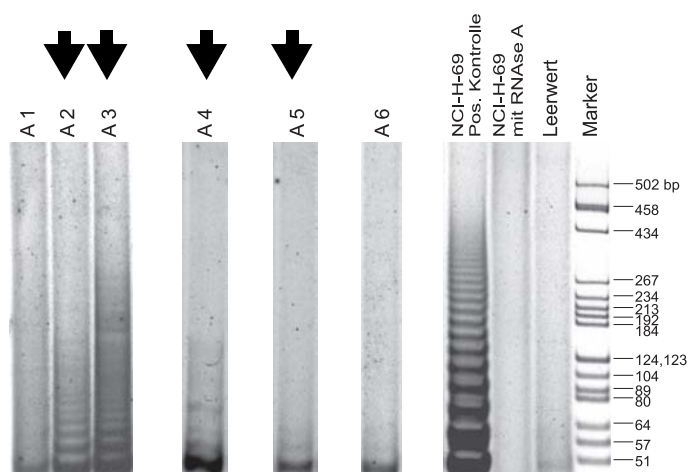


Abbildung 3-11: Gele von positiven Aszitespunktionen

In dieser Abbildung sind alle getesteten Aszitesproben dargestellt. Bei den Proben A 1, A 2 und A 3 handelt es sich wie bereits erwähnt um unterschiedliche Punktionsproben des gleichen Patienten. Die Pfeile indizieren durch den TRAP-Assay nachgewiesene Telomeraseaktivität. Dabei konnte in der ersten Punktionsprobe A 1 des einen Patienten im Gegensatz zu den später gewonnenen Proben A 2 und A 3 noch keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden.

3.2.5 Perikardpunktionen

Bezeichnung	Grunderkrankung	Zytologieergebnis	AP ^a -Aktivität	Telo-merase
PK 1	Mammakarzinom mit gesicherter Perikardkarzinose	enthält maligne Zellen	+	+
PK 2	unklar, evtl. Lymphom	fragliche Tumorzellen	+	+
PK 3	Bronchialkarzinom	V.a. lymphatische Neoplasien, massenhaft Lymphozyten	+	-
PK 4	kein Tumor bekannt	V.a. Tumorzellen, aber eher entzündlich	+	+
PK 5	wie PK 2	fragliche Tumorzellen	+	+
PK 6	unbekannt	keine Tumorzellen	(+) ^b (blutig)	+
PK 7	rezidivierende Perikardergüsse unbekannter Genese	kein Anhalt für maligne Zellen im Erguß	+	-

Tabelle 3-9: Zytologiebefunde Perikardpunktionen

a. AP = Alkalische Phosphatase

b. Aufgrund der blutigen Verfärbung der Probe konnte mit dem auf Absorptionsmessung basierenden Assay zur Messung der Alkalischen Phosphatase Aktivität keine Aussage über die Aktivität dieses Enzyms getroffen werden.

	Telomerase-positiv ^a	Telomerase-negativ	Gesamt
Tumorzellen in Punktions-probe (zytologisch gesichert ^b)	1	0	1
zytologisch fragliche Tumor- zellen in Punktionsprobe	3	0	3
keine Tumorzellen (zytologisch gesichert ^b)	1	2	3

Tabelle 3-10: Vierfeldertafel zu den TRAP-Ergebnissen der Perikardpunktionen

- a. Telomerase-positiv wurde ein Patient gedeutet, wenn entweder Sputum und/oder Lavage eine TRAP-Leiter mit vier Banden in einem Abstand von 6 bp und gleichem Bandenmuster wie die Positivkontrolle ergaben
- b. zytologischer Befund durch das Zentrum für Pathologie und das Zentrum Innere Medizin Abt. Hämatologie/Onkologie der Philipps-Universität Marburg

Bei jeder Perikardpunktionsprobe mit verdächtiger oder positiven Zytologie konnte bis auf Probe PK 3 auch Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Umgekehrt konnte bei PK 7, einer Probe ohne maligne Zellen in der zytologischen Untersuchung, auch keine Aktivität der Telomerase festgestellt werden. Eine andere Probe (PK 6) war Telomerase-positiv, obwohl zytologisch keine Tumorzellen gefunden wurden. Auffällig war bei den Perikardpunktionen, daß die Bandenleiter des TRAP-Assays im Gegensatz zu den anderen Punktionsproben besonders deutlich war, obwohl alle Perikardproben aufgrund ihrer blutigen Konsistenz mehrfach dem Waschschrift mit RCLB und hypertoner Lösung unterzogen wurden.

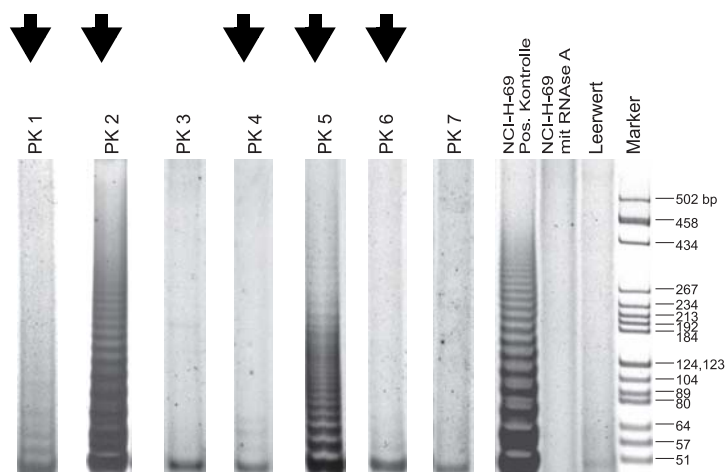


Abbildung 3-12: Gele von positiven Perikardpunktionen

In der obigen Abbildung sind die Gele aller Perikardpunktionen dargestellt. Die Pfeile indizieren dabei durch den TRAP-Assay nachgewiesene Telomeraseaktivität.

3.2.6 Blutproben

Bezeichnung	Grunderkrankung	AP ^a -Aktivität	Telo-merase
B 1	AML	+	+
B 2	AML	+	+
B 3	keine	+	-

Tabelle 3-11: Ergebnisse der Blutproben

a. AP = Alkalische Phosphatase

Bei allen untersuchten Blutproben wurde die Aktivität der Telomerase gezeigt. Die Normalkontrolle B 3 (21jährige Patientin ohne Erkrankungen) hingegen wies keine Telomeraseaktivität auf. Mit der Durchführung des TRAP-Assays bei diesen drei Proben sollte zunächst die Anwendungsmöglichkeit der Methode bei Blutproben und die Eignung dieser einfach zu gewinnenen Körperflüssigkeit im TRAP-Assay generell überprüft werden.

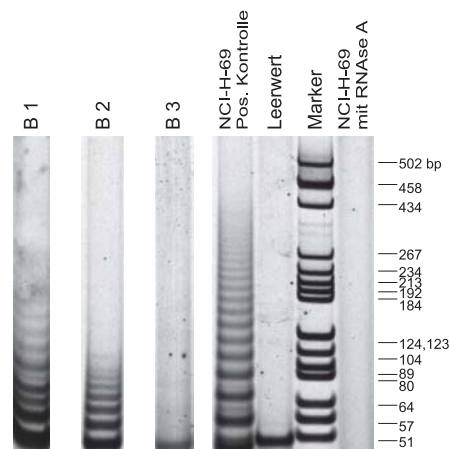


Abbildung 3-13: Gele der Telomerase-positiven Blutproben

Wie man auch der zugehörigen Tabelle 3-7 entnehmen kann, handelt es sich bei den Proben B 1 und B 2 um telomerasepositive Blutproben. Beide Patienten waren an einer AML erkrankt. Die Probe B 3 war eine Kontrolle und zeigte keine Aktivität der Telomerase im TRAP-Assay.

4 Diskussion

Zum besseren Verständnis folgt zunächst eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Eckdaten über das Telomer verlängernde Enzym Telomerase aus der Literatur. Die Aktivität der Telomerase wurde in 90 % aller Tumoren gefunden (KIM et al. 1994, SHAY & BACCHETTI 1997), während gleichzeitig normale Gewebe bis auf wenige bestimmte Zellarten (Stammzellen, embryonische Zellen (WRIGHT et al. 1996)) keine Telomeraseaktivität aufweisen (KIM et al. 1994). MORALES et al. konnten aber 1999 zeigen, daß Telomeraseaktivität *per se* nicht zur malignen Transformation von Zellen führt. Es bewirkt hingegen eine Immortalisierung der Zellen durch Stabilisierung der Telomerlängen. Diese Immortalisierung ist beim Großteil aller Tumoren (90%) eine Grundvoraussetzung für das Überleben (HAHN et al. 1999) und ein frühes Ereignis (POREMBBA et al. 1998) bei der Entstehung von genetisch veränderten Tumorzellen.

Aus diesem Grund glaubt man, daß Telomerase ein wichtiger neuer Marker in der Früherkennung von malignen Tumoren sein könnte (SHAY & BACCHETTI 1997). Von besonderem Interesse ist dabei die Bestimmung von Telomeraseaktivität in Körperflüssigkeiten. Diese kann man entweder minimalinvasiv gewinnen (Urin, Blut), oder sie fallen bei routinemäßig durchgeführten diagnostischen Maßnahmen an und lassen sich so parallel hierzu sammeln. Zu solchen Körpersekreten gehören zum Beispiel Aszites, Pleuraergüsse, Sputum, Bronchial-, Blasen- und Kolonlavagen. Telomerase als zusätzlicher Marker zur zytologischen Untersuchung der Ergüsse konnte bereits bei diesen Körperflüssigkeiten untersucht werden. (YOSHIDA et al. 1997, HEINE et al. 1998, YAHATA et al. 1998, TANGKIJVANICH et al. 1999, MU et al. 1999). Die Bestimmung der Telomeraseaktivität scheint hiernach eine vielversprechende zusätzliche Diagnostik zur Sicherung von malignen Ergüssen zu sein. Trotzdem bestehen bei der Messung von Telomeraseaktivität besonders im Rahmen der klinischen Routine diverse Schwierigkeiten, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

4.1 Methodische Störfaktoren

Die Aktivität der Telomerase wird mittels des TRAP-Assays bestimmt. Um Telomerase auch in Körperflüssigkeiten mit oft geringer Anzahl von malignen Zellen messen zu können, bedarf es eines entsprechend sensitiven Assays. Die Optimierung und Sensitivierung dieses TRAP-Assays wurde in dieser Arbeit beschrieben.

4.1.1 Die Proteinextraktion

Die Probengewinnung sollte unter keimarmen Bedingungen verlaufen, um die Probenkontamination mit ubiquitär vorkommenden RNAsen und Proteasen zu schützen. Dies erfordert bei der Abnahme der Punktion nicht nur eine besondere Sorgfalt des Arztes, sondern auch die Verwendung von sterilisierten oder autoklavierten Auffanggefäßen. Von besonderer Bedeutung ist auch die Zwischenlagerung der Probe nach der eigentlichen Gewinnung. Die Patientenprobe sollte zwar so schnell wie möglich weiterverarbeitet werden, doch stellt die Zeitspanne zwischen Gewinnung und Verständigung des Labors für die Abholung der Probe eine kritische Periode dar. Die Zwischenlagerung sollte immer gekühlt auf Eis oder im Kühlschrank erfolgen, um eine Aktivitätsabnahme der eventuell präsenten Telomerase zu verhindern. Im klinischen Alltag kann dies aufgrund des Zeitmangels, ständig wechselnden, manchmal nicht aufgeklärten Personals, Unachtsamkeit oder einfach wegen Mangels an Eis oder einer anderen Kühlgelegenheit nicht immer garantiert werden. Nach der Probengewinnung sollte stets eine Aufbereitung der Probe stattfinden, die alle Waschschriffe und das Pelletieren und Einfrieren des trockenen Zellpellets umfassen sollte. Besser für die Qualität und Enzymaktivität des Proteinextraktes - wenn auch etwas zeitaufwendiger - ist eine sofortige Proteinextraktion aus den frischen Zellen anstelle des Einfrierens des Pellets. Auch spielt die Erfahrung des die Probe behandelnden Personals für die Qualität des Zellextraktes eine entscheidende Rolle. Dies bedeutet für das untersuchende Labor, daß zu jeder Zeit jemand mit entsprechender Erfahrung für das Entgegennehmen und für die Weiterverarbeitung der kurzfristig angekündigten Patientenproben zur Verfügung stehen muß. Gerade dies kann in der alltäglichen Praxis ein limitierender Faktor sein.

Besonders problematisch können bluthaltige Proben sein. Der vorgeschaltete Waschschriff (siehe Kapitel 2) kann - bei unsachgemäßer oder unvorsichtiger Durchführung - zu einem zum Verlust wertvoller Zellen führen oder zum anderen zu einem nicht unbeträchtlichen Zeitverlust und somit Aktivitätsverlust der Telomerase führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle blutigen Proben diesem Waschschriff unterzogen, weil eine Hemmung der *Taq*-DNA-Polymerase bei der TRAP-PCR wenn auch nur zu einem geringen Anteil befürchtet wurde (YAHATA et al. 1998), was wiederum die Detektion geringster Aktivität der Telomerase verhindern könnte. Es hat sich aber bei der Untersuchung einiger blutiger Extrakte bei dieser Arbeit gezeigt, daß - entgegen der Literatur (YAHATA et al. 1998) - auch diese Extrakte Telomeraseaktivität aufweisen können. Auch bei der Überprüfung auf PCR-Inhibitoren in diesen blutigen Proben wurden keine Inhibitoren nachgewiesen (siehe Kapitel 3). So bleibt zu spekulieren, ob die Aktivität der Telomerase in diesen Proben besonders hoch war, wodurch der TRAP-Assay trotz Anwesenheit von Hämoglobin nur partiell gehemmt wurde und es so

trotzdem zur Darstellung der »TRAP-Leiter« kam.

Bei der Proteinextraktion selbst muß - sofern die Extraktion nicht sofort an das Pelletieren angeschlossen wird - das tiefgekühlte Zellpellet in Lysispuffer aufgetaut werden, um die Proteine der beim Auftauvorgang platzenden Zellen nicht zu verlieren. Der Zusatz von RNase Inhibitor zum Lysispuffer wird standardmäßig bei Arbeiten mit Telomerase eingesetzt (KIM et. al. 1994). Bei dieser Arbeit wurde aber zusätzlich noch PMSF - ein Proteaseinhibitor - dem Lysispuffer zugesetzt. Telomerase besitzt auch Proteinuntereinheiten, die - auch wenn noch nicht vollständig geklärt - *in vivo* bestimmte, die Aktivität beeinflussende Funktionen übernehmen könnten und deshalb auch vor Degradation geschützt werden sollten. Der Proteinextrakt sollte aliquotiert werden nicht nur um Kontaminationen zu verringern, sondern auch um das mehrfache Auftauen und Einfrieren eines identischen Aliquots zu minimieren. Auch die Verwendung eines separaten Aliquots zur Proteinkonzentrationsbestimmung und zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität bewirkt, daß die sich im Stock befindlichen Proteinextrakte nur für den eigentlichen TRAP-Assay und somit nur möglichst kurz und selten aufgetaut werden müssen.

4.1.2 Qualitätsbestimmung des Proteinextraktes

Aufgrund der vielen Störfaktoren, die die Proteinextraktion beeinflussen können, ist eine Qualitätsüberprüfung des Extraktes von großer Bedeutung. Hierfür existieren verschiedene Möglichkeiten. So kann die erfolgreiche Hemmung von Proteasen überprüft werden, indem die Extrakte mit Kasein versetzt werden, welches bei fehlender Proteinasefunktion nicht gespalten werden sollte. Weiterhin wird die Präservation von RNA durch eine RT-PCR eines bestimmten in jeder Zelle vorhandenen Gens (z.B. β -Aktin) nachgewiesen (YOSHIDA et al. 1997). Diese beiden Methoden werden durchgeführt, weil Telomerase ohne ihre RNA-Untereinheit (NIIDA et al 1998, LEE et al. 1998, KONDO et al. 1998) und enzymatische Untereinheit (NAKAMURA et al. 1997, MEYERSON et al. 1997, HARRINGTON I et al. 1997, KILIAN et al. 1997, NAKAYAMA et al. 1998) nicht funktionsfähig ist. Trotzdem ist das Vorhandensein der Untereinheiten *per se* für die Enzymaktivität *in vivo* nicht allein entscheidend. Vielmehr spielen auch andere Faktoren wie die korrekte Zusammenlagerung der Untereinheiten, der Phosphorylierungszustand (LI et al 1997) und vielleicht noch andere unbekannte Komponenten eine wichtige Rolle für die enzymatische Aktivität der Telomerase. Außerdem sind die beiden genannten Methoden recht aufwendig in der Durchführung im Hinblick auf die Anwendung in der klinischen Routine, weil diesen zwei zusätzliche

zeitaufwendigen und störanfälligen Experimente den TRAP-Assay weiter komplizieren.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Aktivität eines Indikatorenzyms als Maß der Extraktqualität gemessen. Es wurde ein der Telomerase hinsichtlich Halbwertszeit bei Raumtemperatur ähnliches Referenzenzym gewählt, die Alkalische Phosphatase (WRIGHT et al. 1995, HEINE et al. 1998). Es wurde ein einfach anwendbares Protokoll entwickelt, welches die Qualitätsüberprüfung des Proteinextraktes sehr erleichtert. Ein Nachteil dieser Methode war wiederum, daß circa 60 µg Protein benötigt wurde. Bei Extrakten aus geringem Ausgangsmaterial umfaßte diese Menge einen nicht unbeträchtlichen Teil des gesamten Vorrates. Allerdings konnte aus den meisten Patientenproben im Rahmen dieser Arbeit soviel Extrakt gewonnen werden, daß diese Menge kaum eine Dezimierung des Extraktvorrates bewirkte. Die Alkalische Phosphatase selbst besitzt keine RNA-Untereinheit, so daß ein Fehlen oder die Degradation dieser RNA mit der Messung dieses Referenzzyms nicht erfaßt wurde. Durch sehr sauberes Aufbereiten der Proben und Zufügen einer ausreichenden Menge an RNase Inhibitor wurde dieses Problem minimiert.

Das verwendete Substrat ist lichtempfindlich, so daß bei ungenügender Abdunklung des Versuchsbereiches die Gefahr die Verzeichnung stark schwankender Meßwerte bestand. Eine Wiederholung des Versuches war häufig aufgrund der großen Menge an benötigtem Proteinextrakt nicht möglich. Deshalb war die gute Planung und sehr sorgfältige Durchführung des Experiments mit allen Pipettier- und Meßschritten von großer Bedeutung. Alle Meßwerte wurden in relative Einheiten umgerechnet, um so einen Vergleich der Werte zu erhalten.

4.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um möglichst äquivalente Mengen an Protein beim TRAP-Assay einzusetzen, mußte die Konzentration der Proteinextrakte gemessen werden. Vor der Extraktion selbst wurde die Zellzahl nicht durch Zählung bestimmt, weil man ein zu langes Verweilen der Probe und eine Verschwendung der wenigen vorhandenen Zellen vermeiden wollte. So wurde die Größe des Zellpellets geschätzt und entsprechend der Erfahrungswerte bei Zelllinien eine entsprechende Menge an Lysispuffer verwendet. Die Zellzahl in den Patientenproben schwankte sehr, so daß auch die Proteinkonzentrationen einigen Schwankungen unterlegen war. Eine Messung der Proteinkonzentration war mit der beschriebenen Methode (siehe Kapitel 2) bei Konzentrationen unter 0,5 µg/µl oder über 6 µg/µl nicht möglich. Durch Erfahrung ließ sich jedoch die Menge an eingesetztem Lysispuffer so wählen, daß immer ein Konzentration

zwischen circa 2 µg/µl und 4 µg/µl erzielt werden konnte.

4.1.4 Die Komplexität des TRAP-Assays

4.1.4.1 Varianten des TRAP-Assays im Vergleich

Für die Durchführung des TRAP-Assays gibt es verschiedene Möglichkeiten. Diese umfassen:

- »klassischer TRAP-Assay« nach KIM et al. 1994
- semi-quantitativer Assay mit modifizierten Primern (radioaktiv) (KIM & WU 1997)
- semi-quantitativer Assay mit fluoreszenzmarkierten Primern (OHYASHIKI et al. 1996 I)
- *in-situ* TRAP-Assay (OHYASHIKI et al. 1997)
- TRAP-Assay mit Hilfe des TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kits von *Oncor Appligene*[®]
- TRAP-ELISA Kit[®] von *Roche-Boehringer-Mannheim*[®]

Alle genannten TRAP-Assay Methoden beruhen in ihrer Basis auf der Methode von KIM et al. 1994. Die beiden zuletzt genannten »Kits« sind für die Anwendung ohne großer Erfahrung bei der Durchführung von TRAP-Assays gedacht. Sie beinhalten alle notwendigen Chemikalien und Lösungen. Der TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit von *Oncor Appligene*[®] wurde im Rahmen dieser Arbeit auf seine Nützlichkeit und Anwendbarkeit auf Proben mit sehr geringem Anteil an malignen Zellen überprüft. Wie in Kapitel 3 dargestellt, ist aber die Sensitivität dieses Kits für bestimmte Proben - insbesondere Körperflüssigkeiten - nicht ausreichend für eine zufriedenstellende Detektion der Telomeraseaktivität. Außerdem besteht eine beträchtliche Kontaminationsgefahr und nachfolgende Fehlinterpretation der Ergebnisse gerade bei Anwendung des Kits durch unerfahrene Untersucher. Auch bei dem TRAP-ELISA Kit[®] von *Roche-Boehringer-Mannheim*[®] ist die Nachweisgrenze nach Angaben des Herstellers (*Roche-Boehringer-Mannheim*[®]) nicht ausreichend für eine sensitive Detektion von malignen Zellen in zytologischen Proben.

Die Versuchsanordnung des »klassischen Assays« von KIM et al. 1994 bringt ebenfalls einige Probleme mit sich. Ähnlich wie beim TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit von *Oncor Appligene*[®] werden radioaktive Nucleotide zur Detektion verwendet. Hierdurch fallen radioaktive Abfälle an, deren Entsorgung an strenge Richtlinien gebunden sind. Zusätzlich birgt der Umgang mit radioaktiven Stoffen eventuelle gesundheitliche Gefahren für den Untersucher. Weiterhin kommt komplizierend hinzu, daß mit einer trennenden Wachsicht gearbeitet wird, deren Einfügen einen zusätzlichen, zeitverzögernden Arbeitsschritt darstellt

und die Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase beeinträchtigen kann.

Das größte Problem bei der Durchführung des Assays nach dem Originalprotokoll von KIM et al. 1994 ist die Bildung von Artefakten aufgrund der verwendeten Primer und die mögliche falsche Deutung der Ergebnisse. Bei der Verwendung von TS und CX als Primerkombination kann eine Dimerisierung stattfinden, die wiederum die gestaffelte Primeranlagerung (*»Staggered Annealing«*) ermöglicht (KIM et al. 1994, KRUPP et al. 1997) (siehe Abbildung 4-1). Das bei der PCR amplifizierte Produkt sieht der »TRAP-Leiter« ähnlich und kann nur bei genauem Vergleich mit der Normalkontrolle als Artefakt erkannt werden, weil die Banden eine andere Produktgröße besitzen.

Erst eine Verlängerung dieses CX-Primers um einige Basen (*»Anker«*) schränkt das *»Staggered Annealing«* zumindest stark ein, obgleich die Primerdimerisierung nicht verhindert werden kann (KRUPP et al. 1997).

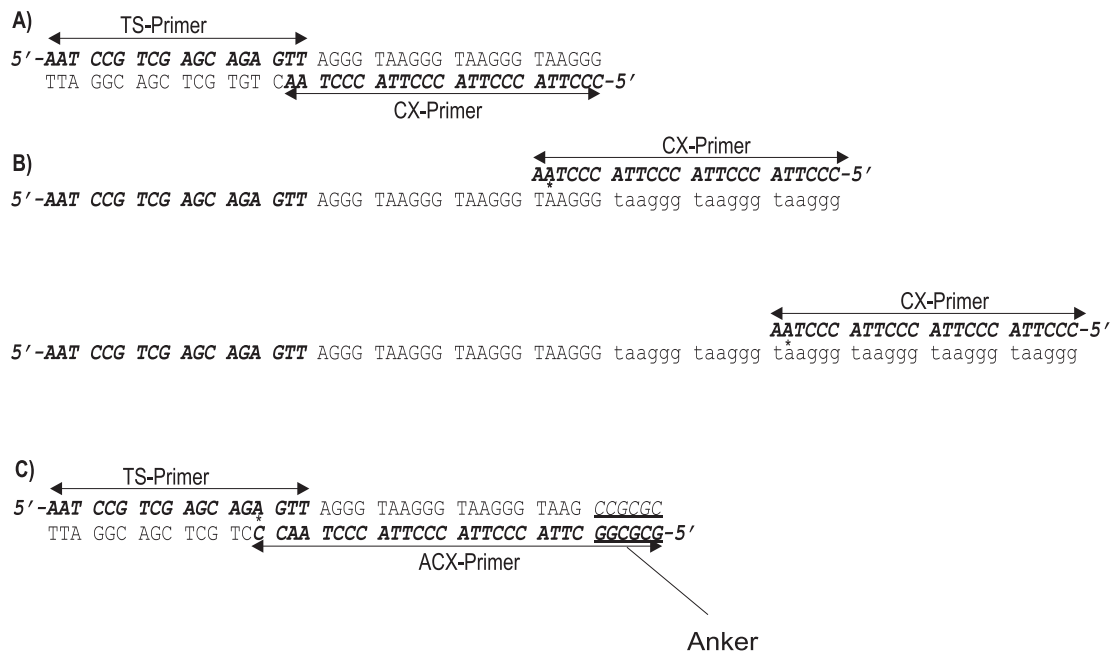


Abbildung 4-1: »Staggered Annealing« (gestaffelte Anlagerung der Primer)

A) Bei Verwendung von TS und CX ist eine Primerdimerisierung begünstigt. Beide Stränge werden während der PCR elongiert.

B) In einem nächsten Schritt kann sich CX gestaffelt an den neuen Strang anlagern, wodurch es zu einer weiteren Elongation des Stranges kommt. Dieses *»Staggered Annealing«* kann sich nun viele Male wiederholen. Das Produkt ergibt in einem Gel ebenfalls eine Leiter, die leicht mit einer eigentlichen »TRAP-Leiter« verwechselt werden kann.

C) Die Verlängerung des CX-Primers um mehrere Basen (Anker) - im Falle des ACX um sechs Basen - verhindert nicht die Dimerisierung aber die gestaffelte Anlagerung der Primer.

Die absichtlich eingefügten Mismatches (*) sollten eigentlich eine Dimerisierung der Primer verhindern (KIM et al. 1994).

Aus diesem Grund wurde der TRAP-Assay auf bestimmten Gebieten weiterentwickelt. So wurden die Primersequenzen modifiziert und ACX mit einem sechs Basen langen Anker als

reverse-Primer eingesetzt, um das Problem des »*Staggered Annealings*« zu lösen. Gleichzeitig wurde der PCR-Ansatz des TRAP-Assays so verändert, daß ein zusätzliches Produkt bestimmter Größe (hier 36 bp) amplifiziert wurde, welches als interne Kontrolle dienen sollte. Dabei wurde das Template »TSNT«, als *forward*-Primer ebenfalls der TS-Primer und als zusätzlichen *reverse*-Primer »NT« eingesetzt. Dadurch konnte gleichzeitig eine Semi-Quantifizierung sowie der Ausschluß der Anwesenheit von PCR-Inhibitoren stattfinden. Die Wachsschicht und somit der zusätzliche Arbeitsschritt entfielen (KIM & WU 1997). Es konnte aber bei der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die zusätzliche Amplifikation einer internen Kontrolle die Sensitivität des Assays stark beeinträchtigt. Außerdem wurde die Erfahrung gemacht, daß auch mit den modifizierten Primern neben der weiter fortbestehenden Dimerisierung (KIM & WU 1997) zusätzliche Banden mit ähnlichem Aussehen wie die »TRAP-Leiter« entstanden, die eine Interpretation der Ergebnisse erschwerten.

Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern zusammen mit einer internen Kontrolle und die Auswertung auf einem Autosequencer erleichtert die Detektion insofern, als daß keine Gefahren durch die Verwendung radioaktiver Nucleotide bestehen (OHYASHIKI et al. 1996 I). Weiterhin kann das Ergebnis in *real time* während der noch laufenden Reaktion semi-quantitativ erfaßt werden. Dabei kann eine basengenaue Unterscheidung zwischen TRAP-Produkten und Artefakten auch mit nur gering unterschiedlicher Produktgröße zur »TRAP-Bandenleiter« vorgenommen werden. Trotzdem kann man auch hier aufgrund des Einsatzes einer internen Kontrolle von Sensitivitätseinbußen ausgehen. Ein großer Nachteil bei dieser Methode ist, daß teure Detektionsgeräte und die zugehörige Software zur Verfügung stehen müssen. Es kann nicht unbedingt davon ausgegangen werden, daß ein Routinelabor sowie ein durchschnittliches Forschungslabor Zugang zu dieser Geräteausrüstung besitzt.

Der Einsatz eines *in situ*-TRAP-Assays ermöglicht den Nachweis der Aktivität der Telomerase auf zellulärer Ebene (OHYASHIKI et al. 1997). So können in individuellen Zellen mikroskopisch über eine Fluoreszenzdetektion Telomeraseaktivität nachgewiesen und so eine Differenzierung zwischen malignen und normalen benignen Zellen vorgenommen werden. Ein Nachteil dieser Variation des TRAP-Assays ist, daß eine Anwendung auf Gewebe, die vorher aus Gründen der Konservierung gefroren wurden, nicht möglich ist (OHYASHIKI et al. 1997). Vielmehr eignet sich nur frisches Material mit noch erhaltenen Zellen. Außerdem werden für die Durchführung zusätzliche teure Geräte wie einen Thermocycler für die *in situ*-PCR und ein Fluoreszenzmikroskop mit bestimmten Filtern benötigt. Eine Anschaffung lohnt sich nur bei einem hohen Probendurchsatz oder bei anderweitiger

Verwendung der Geräte für andere Bereiche.

Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein TRAP-Assay etabliert und optimiert, der ohne zusätzliche Anschaffung neuer Geräte in einem durchschnittlich ausgestatteten Labor einfach durchzuführen ist aber besonders sensitive und zuverlässige Ergebnisse erzielt. Dies ist von besonderer Bedeutung hinsichtlich einer eventuellen späteren Anwendung in der klinischen Routinediagnostik von Körperflüssigkeiten verschiedener Art.

4.1.4.2 Störfaktoren bei der Durchführung des TRAP-Assays

Der TRAP-Assay wie er in dieser Arbeit beschrieben wird (siehe Kapitel 2) wurde vor allem hinsichtlich Sensitivität und Validität optimiert. So zeigte sich, daß die Durchführung des Assays mit radioaktiven Nucleotiden sinnvoll war. Der Einsatz von [$\gamma^{33}\text{P}$]-dCTP war allerdings nicht geeignet. Bei der reversen Transkription der telomerischen [TTAGGG]-Repeats durch die Telomerase wird dCTP nicht benötigt. Schließlich findet der Einbau von dCTP nur bei der Polymerisierung der Tochterstränge während der PCR statt, was wiederum nicht ausreichend für eine zufriedenstellende Detektion der Banden war. Aus diesem Grund wurde der TS-Primer radioaktiv markiert. Diese Kinasierungsreaktion stellte aber auch einen zusätzlichen, den TRAP-Assay komplizierenden Zwischenschritt dar, der aber aufgrund der starken Verbesserung der Sensitivität gerechtfertigt erschien. Ebenfalls aus Gründen der Sensitivität wurde auf eine anschließende Säulenreinigung des TS-Primers verzichtet. Der TS-Primer selbst bestand nur aus 18 bp, so daß bei einer Aufreinigung zuviel dieses Primers am Säulenmaterial adsorbiert wurde und somit verloren ging. Ein Nachteil war, daß auch die im Kinasierungsansatz enthaltenen freien radioaktiven Nucleotide in den TRAP-Assay eingesetzt wurden, wodurch eine vermehrte radioaktive Strahlung freigesetzt wurde und der anfallende Abfall etwas stärker belastet war. Generell darf ein TRAP-Assay mit dem Einsatz von radioaktiven Nucleotiden nur in dafür vorgesehenen und entsprechend ausgestatteten Labors durchgeführt werden.

Aus Gründen der Kontaminationsgefahr muß beim TRAP-Assay auf die Einhaltung bestimmter Arbeitsregeln streng geachtet werden (siehe Kapitel 2). So zeigte sich bei der anfänglichen Anwendung des TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kits von *Oncor Appligene*[®], daß trotz sauberer Arbeitsweise eine so geringe Menge von 0,1 aMol (10^{-19} Mol) regelmäßig ausreichte, Primer- und dNTP-Aliquots zu kontaminieren.

Für den Einsatz einer trennenden Wachsschicht während des Telomerase-Extensionsschrittes des TRAP-Assays entschied man sich aufgrund von Problemen mit PCR-Artefakten. Bei

Optimierungsversuchen für die vorliegende Arbeit zeigte sich, daß der Einsatz des *reverse*-Primers ACX mit dem beschriebenen Anker das Artefaktproblem nicht lösen konnte. So war bekannt, daß auch mit den neuen Primern eine Dimerisierung stattfinden konnte (KIM & WU 1997). Es ist möglich, daß die beobachteten Banden im Leerwert und in definitiv telomerasenegativen Proben aus dem »*Staggered Annealing*« ähnelnden Prozessen stammen. Die Entstehungsweise konnte aber nicht sicher geklärt werden. Eine Kontamination wurde ausgeschlossen. Es konnte aber die Beobachtung gemacht werden, daß die Verwendung von dNTP Aliquots, die nicht öfter als fünfmal aufgetaut und eingefroren wurden, das Auftreten der Artefakte vermindern aber schließlich nicht ganz vermeiden konnten. Mit dieser Versuchsanordnung war allerdings die Interpretation der Ergebnisse stark erschwert.

Aus diesem Grund wurden die beiden Primer im Reaktionsansatz mit Hilfe einer Wachsschicht räumlich voneinander getrennt. Die Artefaktbanden konnten mit sofortiger Wirkung beseitigt werden. Dies wurde vermutlich dadurch erreicht, daß die beiden Primer während des Telomeraseextensionsschrittes nicht miteinander interagieren konnten. Nach der Schmelze der Wachsschicht und Aufhebung der räumlichen Trennung zu Beginn der PCR herrschten aufgrund der Temperaturbedingungen für die Primerdimerisierung und das Zustandekommen anderer Artefakte thermisch ungünstige Verhältnisse. Die zusätzliche Wachsschicht verhinderte falsch positive Ergebnisse. Ein Nachteil dabei war der Zeitverlust beim Einfügen der Wachsschicht, der die Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase negativ beeinflussen könnte. Zügiges Arbeiten jedoch hielt diesen Aktivitätsverlust vernachlässigbar gering.

Zur Erhöhung der Sensitivität wurde der optimierte TRAP-Assay ohne interne Kontrolle durchgeführt. Eine gleichzeitige Semiquantifizierung der Ergebnisse war nun nicht mehr möglich. Die mögliche Anwesenheit von PCR-Inhibitoren mußte in einem separaten zweiten Experiment ausgeschlossen werden. Dadurch fand ein doppelter Verbrauch aller TRAP-Assay Komponenten statt. Aus diesem Grund wurde auf die vollständige Semiquantifizierung aller Ergebnisse verzichtet und die Anwesenheit der PCR-Inhibitoren mit Hilfe der internen Kontrolle nur bei im ersten TRAP-Assay Telomerase-negativen Proben ausgeschlossen. Die Sensitivität konnte allerdings durch den TRAP-Assay ohne interne Kontrolle stark erhöht werden. Mit dem beschriebenen Experimentansatz konnte die Aktivität der Telomerase in bis zu 10 Zellen in einem Proteinextrakt aus einem heterogenen Zellgemisch aus Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden.

Die Erniedrigung der Sensitivität bei Zugabe der internen Kontrolle könnte wie folgt erklärt werden: für die Amplifikation der internen Kontrolle wurde neben einem separaten *reverse*-

Primers NT das Oligonucleotid TS als *forward*-Primer benötigt. Dabei wurde gleichzeitig die Menge an TS nicht erhöht. TS war also im selben Reaktionsansatz *forward*-Primer für das Telomeraseextensionsprodukt und die interne Kontrolle, wodurch verhältnismäßig eine geringere Menge des Oligonucleotids TS, dNTPs und *Taq*-DNA-Polymerase für die Amplifikation des eigentlichen Produktes des TRAP-Assays zur Verfügung stand.

4.1.5 Gelelektrophorese

Bei der anschließenden Gelelektrophorese wurden die einzelnen Komponenten ebenfalls optimiert, so daß es zu einer klaren Auftrennung der TRAP-Produkte kam. Es war noch nie zuvor beschrieben worden, daß besonders der Einsatz eines bestimmten Gelladepuffers großen Einfluß auf die Bandenauflösung hat. Die deutliche Auftrennung der Banden der »TRAP-Leiter« war für die definitive Entscheidung über das Produkt von Bedeutung, um eine Aussage über die Aktivität der Telomerase im entsprechenden Extrakt treffen zu können.

4.1.6 Untersucherabhängigkeit und Entscheidungskriterien

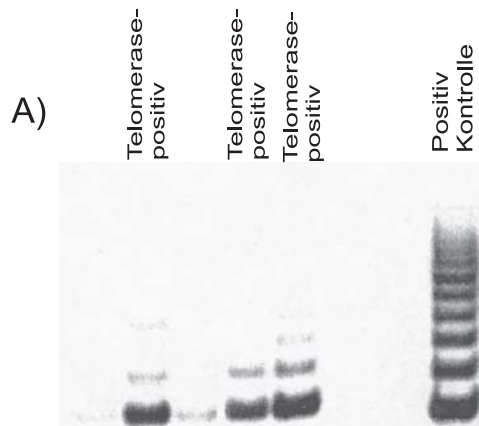
Im Laufe dieser Arbeit konnte die Beobachtung gemacht werden, daß das Gelingen des TRAP-Assays im Ganzen vor allem bei gering Telomerase-positiven Proteinextrakten sehr stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig war. Dies bezog sich einmal auf die Gewinnung der Patientenprobe, die für diese Arbeit von erfahrenen Ärzten verrichtet wurde. Gleichzeitig waren aber vor allem die Probenaufbereitung und die eigentliche Durchführung des TRAP-Assays von der Untersucherabhängigkeit betroffen. Für die Anwendbarkeit des TRAP-Assays bedeutet dies, daß er für eine verlässliche Diagnostik nur solchen Zentren mit entsprechend ausgebildetem und erfahrenem Personal vorbehalten bleibt. Die Abhängigkeit des stark sensitiven Assays von der Erfahrung des Untersuchers beweist den Einfluß multipler Faktoren auf seine Empfindlichkeit und Optimierung.

Häufig bestehen bei der Interpretation des Ergebnisses des TRAP-Assays große Unterschiede bei den Kriterien für eine Entscheidung für Telomeraseaktivität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Probe dann als Telomerase-positiv gewertet, wenn eine Bandenleiter mit mindestens vier Banden sichtbar war, die in ihrer Produktgröße der Positivkontrolle entsprach (siehe zum Beispiel Abbildung 3-8).

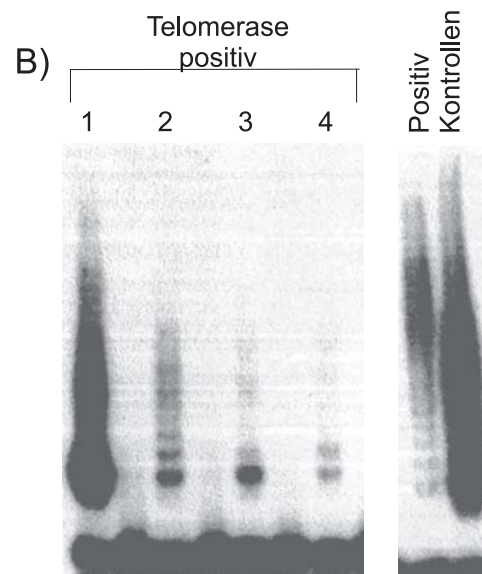
Beim Vergleich der in der Literatur gezeigten Gele von Telomerase-positiven Extrakten

gewonnen aus verschiedenen Körperflüssigkeiten muß man einige dieser Ergebnisse kritisch betrachten. Entweder haben die Abbildungen der veröffentlichten Gele aufgrund technischer Umstände in ihrer Qualität eingebüßt und zeigten in der Realität noch etwas andere Bandenmuster, oder aber man hatte bei den Entscheidungskriterien für die Aktivität der Telomerase eine sehr niedrige Grenze gesetzt (YOSHIDA et al. 1997 I, SUEHARA et al. 1997, MU et al. 1999).

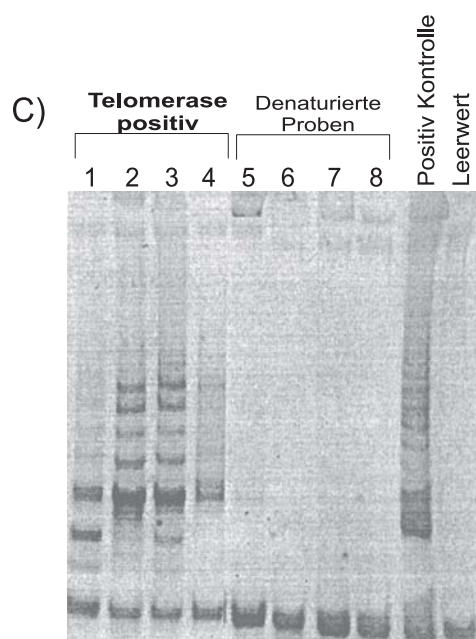
Abbildung 4-2: Vergleich verschiedener Bandenmuster in der Literatur



A) YOSHIDA et al. 1997 I: Gezeigt sind drei von den Autoren als Telomerase-positiv gewertete Proben. Dabei ist bei den ersten beiden Proben (von links) keine eindeutige Ähnlichkeit zur TRAP -Leiter der Positivkontrolle zu erkennen.



B) SUEHARA et al. 1997: Die als Proben mit Telomeraseaktivität bezeichneten Proben 3 und 4 besitzen auch hier kaum Ähnlichkeit mit den beiden TRAP-Leitern der Zelllinien (Positivkontrollen). Eine eindeutige Interpretation ist hier nicht unbedingt möglich.



C) *MU et al. 1999*: Die Abbildung zeigt das Gel eines mit dem TRAPEZE® Telomerase Detection Kit von *Oncor Appligene®* durchgeführten TRAP-Assays. Hier sind die Proben 1 und vor allem 4 hinsichtlich der Telomeraseaktivität kritisch zu betrachten. Auch die gezeigte Positivkontrolle besitzt eine geringere Bandenqualität als in dieser Arbeit und in den meisten anderen Publikationen.

Die Bandenqualität sowie die Entscheidungskriterien für Telomeraseaktivität können sehr unterschiedlich sein und sind von der Interpretation des Untersuchers abhängig. Für eine Anwendung des TRAP-Assays in der Routine muß eine standardisierte Entscheidungsgrenze festgelegt werden, um Überinterpretationen möglicherweise falsch-positiver Ergebnisse zu vermeiden.

4.2 Untersuchung der Patientenproben auf Telomeraseaktivität

4.2.1 Sputen und Lavagen der Bronchoskopie

Die Aufbereitung dieser Patientenproben wurde von diversen Problemen begleitet. Die Sputen und Lavagen wurden direkt zu Beginn der bronchoskopischen Untersuchung gewonnen. Dies hatte den Vorteil, daß sie nur äußerst selten sichtbar mit Erythrozyten kontaminiert waren und deshalb keinem Waschschrift mit RCLB und hypertonischer Lösung unterzogen werden mußten. Dadurch ergab sich ein Zeitvorteil. Dieser wurde allerdings durch die Tatsache relativiert, daß eine ideale Zwischenlagerung der Proben aufgrund der Hektik im klinischen Alltag und aufgrund des Personalmangels nicht immer garantiert war. Trotz gewissenhafter Aufklärung über die Bedeutung der sofortigen Kühlung der Proben und Verständigung des zuständigen Labors war die Durchführung der Anweisungen im

klinischen Alltag nicht immer möglich. So lag manchmal unterschiedlich viel Zeit zwischen der Gewinnung, der kühlen Lagerung und der Weiterverarbeitung der Proben, was zu einer Verminderung einer eventuell vorhandenen Telomeraseaktivität geführt haben könnte. Außerdem konnte die Einhaltung der Anweisungen nicht protokolliert oder kontrolliert werden. Diese Tatsache könnte ein Grund für die fehlende enzymatische Grundaktivität in einigen Proben gewesen sein, die durch die fehlende Aktivität der Alkalischen Phosphatase aufgezeigt wurde.

Die Aufbereitung der Proben und die Proteinextraktion wurde durch die starke Viskosität des Mucus in diesen Proben erschwert. Aus diesem Grund wurde vor jeder Extraktion eine Ampulle ACC zu den Proben gegeben, beides vermischt und auf Eis inkubiert. Diese Methode führte bei Proben mit mittelgradiger Viskosität, die den Großteil der Proben ausmachten, zu erheblich besseren Ergebnissen. Das Material wurde verflüssigt, wodurch im anschließenden Zentrifugierschritt ein Zellpellet erzeugt werden konnte, aus dem die Proteinextraktion erfolgte. Bei der Messung der Proteinkonzentration konnten dann zufriedenstellende Werte zwischen 1,5 und 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ festgestellt werden. Bei stark viskosen Proben allerdings war die Proteinextraktion auch mit Hilfe des ACCs nur sehr schlecht möglich, weil eine Pelletierung der im Mucus verfangenen Zellen auch durch mehrfache Zentrifugievorgänge nicht erreicht werden konnte.

Bei der Untersuchung der Proben mit Hilfe des optimierten TRAP-Assays konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Tumors und der Aktivität der Telomerase festgestellt werden. So konnte außer bei drei Patienten in fünf von acht Patienten mit einem gesicherten Lungentumor auch Telomeraseaktivität in Sputum und/oder Lavage festgestellt werden. Dabei mußte immer die Messung der Alkalischen Phosphatase zur Detektion der Telomerase in Bezug gesetzt werden. Bei beiden Proben eines der drei Patienten mit Tumor aber ohne Telomeraseaktivität (S006 und L006) sowie bei verschiedenen anderen Einzelproben ohne Aktivität der Telomerase (Sputum oder Lavage) wiesen die Proteinextrakte auch keine Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase auf. Einige Gründe für dieses Phänomen könnten eine zu lange Lagerung der Proben bei Zimmertemperatur, das Vorkommen von Proteinasen oder sonstige denaturierende Bedingungen gewesen sein. Man konnte bei diesen Proben keine Aussage über das Vorliegen von Telomeraseaktivität treffen. Bei einem weiteren der drei Patienten mit Lungentumor aber ohne Telomeraseaktivität (S010 / L010) wurde die Tumordiagnose nicht über jene Biopsien gestellt, die - wie die mit dem TRAP-Assay untersuchten Proben - während der Bronchoskopie gewonnen wurden. Diese Biopsien wiesen in der histopathologischen Untersuchung keine malignen Veränderungen sondern nur eine geringgradige Bronchitis auf. Erst eine nachträgliche Stanzbiopsie durchgeführt von einem Radiologen aufgrund einer verdächtigen Verschattung

im Thoraxröntgenbild des Patienten ergab histopathologisch ein verhorntes Plattenepithelkarzinom. Es saß vermutlich zu tief im Bronchialbaum, um vom Bronchoskop erfaßt zu werden. So waren möglicherweise auch keine malignen Zellen im Sputum oder in der Lavage vorhanden, weshalb keine Telomeraseaktivität festgestellt werden konnte.

Schließlich blieb von den drei Lungentumorpatienten ohne Telomeraseaktivität ein Patient, bei dem tatsächlich die Bestimmung der Telomeraseaktivität nicht mit der histopathologischen Diagnose übereinstimmte (S013 / L013).

Bei einer Probe (S009) blieb offen, warum hier eine Aktivität der Telomerase aber keine der Alkalischen Phosphatase gemessen wurde. Vermutlich handelte es sich um einen Pipettierfehler bei der Alkalischen Phosphatase Testung, die wegen des hohen Verbrauchs an Proteinextrakt nicht wiederholt werden konnte, während aber das Vorliegen der Telomeraseaktivität durch drei TRAP-Assays auch dreifach verifiziert werden konnte.

Bei eben dieser Patientenprobe (S009) sowie bei einer weiteren (S007) konnte die Aktivität der Telomerase auch bei mehrfacher Wiederholung des TRAP-Assays detektiert werden, obwohl bei beiden Patienten bei der histologischen Untersuchung der Biopsien aus der Bronchoskopie kein pathologischer Befund erhoben werden konnte. Die Telomeraseaktivität ist nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit auf die Anwesenheit von Leukozyten, die eine geringe Aktivität dieses Enzyms aufweisen (COUNTER et al. 1995), zurückzuführen, weil die betreffenden Patienten keine Entzündung im Bronchialsystem aufwiesen und somit höchstwahrscheinlich keine Leukozyten in den Sputen vorhanden waren. Außerdem konnte umgekehrt selbst bei Patienten mit einer floriden Bronchitis mit eitrigem Sputum und eitriger Lavage keine Telomeraseaktivität festgestellt werden (z.B. S016/L016). Die Anwesenheit von Leukozyten führte bei dem in dieser Arbeit durchgeführten TRAP-Assay zu keiner Detektion von Telomeraseaktivität. So wurden bei beiden Patienten der Proben S009 und S007 Nachforschungen angestellt, ob sie einige Monate nach der Bronchoskopie einen Tumor zum Beispiel im unteren oder oberen Respirationstrakt, im Mediastinum oder aber auch in anderen Organen entwickelt hatten. Die Patienten waren jedoch klinisch nicht weiterverfolgt worden, so daß auch jetzt nach über einem Jahr nach der Untersuchung keine Informationen zu ihrem jetzigen Gesundheitszustand erhältlich waren. Von besonderem Interesse wäre aber eine ambulante oder hausärztliche Beobachtung solcher Patienten gewesen, um mehr über die Aussagekraft der Telomeraseaktivität hinsichtlich einer Tumorfrüherkennung zu erfahren. Es bleibt ungeklärt, warum bei diesen Patienten eine Telomerasedetektion ohne einer zum Zeitpunkt der Probengewinnung vorliegenden Tumorerkrankung gelungen ist.

Die Patientenprobe L026 wies Telomeraseaktivität auf, obwohl in der bronchoskopischen

Untersuchung und in den hierbei gewonnenen Biopsien des Patienten kein Lungentumor entdeckt werden konnte. Schließlich wurde bei der histologischen Untersuchung eines chirurgisch entfernten verdächtigen Lymphknotens aus dem Retroperitoneum desselben Patienten eine Adenokarzinometastase diagnostiziert. Das Gewebe des Lymphknotens könnte bereits die Lunge oder Bronchien an einer distalen Stelle durchdrungen haben, die vom Bronchoskopeur nicht probeexzidiert wurde oder werden konnte. Es ist denkbar, daß die vermutlich von diesem Lymphknoten stammenden malignen Zellen in der Lavage durch den Nachweis der Telomeraseaktivität erfaßt wurden.

Die Untersuchung der bronchoskopisch gewonnenen Patientenproben zeigten, daß ein enger Zusammenhang zwischen histopathologischer und bronchoskopischer Diagnose sowie der Bestimmung der Telomeraseaktivität in den Proteinextrakten dieser Proben bestand. Dies war übereinstimmend mit den Ergebnissen von YAHATA et al. 1998. Der Goldstandard für die Diagnosestellung ist die histopathologische Untersuchung der Probeexzisionen der Bronchoskopie. Aus diesem Grund wurde bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben eine zytologische Untersuchung nur selten durchgeführt (8 von 33). Ein parallel hierzu durchgeführter Nachweis der Aktivität der Telomerase im Sputum und in der Lavage der bronchoskopierten Patienten könnte hinsichtlich der Diagnosestellung zur Steigerung der Aussagekraft der zytologischen Proben der Bronchoskopie beitragen.

Dabei sollte besonders darauf geachtet werden, daß Sputum und Lavage eines Patienten parallel zueinander untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich keinesfalls nur eines dieser beiden Materialien besonders für die Detektion der Telomeraseaktivität eignet. Bei einigen Patienten konnte das Enzym im Sputum aber nicht in der Lavage nachgewiesen werden, bei anderen Patienten war genau das Umgekehrte der Fall. Der Grund für dieses Phänomen könnte darin liegen, daß Sputum Zellen aus einem Areal enthält, welches beide Bronchialbäume an ihrem anatomischen Ursprung ohne die tieferen Abschnitte und Äste erfaßt. Eine Lavage wird regional an einer bestimmten Stelle des Bronchialbaumes gewonnen, so daß vor allem Zellen dieses spezifischen Gebietes in ihr enthalten sind. Befindet sich an dieser Stelle oder in unmittelbarer Nähe ein Tumor, so werden mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch maligne Zellen mit der Lavage gewonnen, die wiederum zum Nachweis der Telomeraseaktivität in dieser Probe führen. Befindet sich allerdings der Tumor in einem anderen, proximaleren Anteil des Bronchialbaumes, so erwartet man maligne Zellen mit höherer Wahrscheinlichkeit im Sputum als in der Lavage. In diesem Fall wäre eine Aktivität der Telomerase eher im Sputum nachzuweisen.

Für genaue Aussagen muß eine größere Probenzahl von Patienten mit malignem Tumor

untersucht werden. Weiterhin müssen Patienten mit Telomeraseaktivität aber ohne histopathologisch festgestelltem Tumor langfristig weiterverfolgt werden, um eine eventuelle Tumorentstehung zu erkennen. Auf diese Weise könnte geklärt werden, ob sich Telomeraseaktivität als Früherkennungsmarker in der klinischen Praxis eignet.

4.2.2 Sputum von Patienten auf Station

Diese Proben, die auf Station von dort befindlichen Patienten gewonnen wurden, eigneten sich nicht für die Untersuchung mit dem TRAP-Assay. Im Gegensatz zu den Sputen, welche bei der Bronchoskopie gewonnen wurden, wurden diese Sputen ohne vorherige sekretlösende Maßnahmen wie die Inhalation von Kochsalzlösung gewonnen. Die Patienten wurden lediglich gebeten, etwas Sekret in ein steriles Gefäß abzuhusten. Alle Patienten befanden sich im Endstadium ihrer Lungentumorkrankung. Häufig hatte dabei der Tumor bereits große Teile des Bronchialbaums verschlossen, so daß ein Abhusten von Sputum aus diesen Regionen sehr schwer möglich war. Die Probengewinnung auf diese Weise stellte für die Patienten, die zum Großteil nur noch sehr schlecht atmen konnten, eine große Anstrengung dar. So muß man davon ausgehen, daß die untersuchten Sputen nicht unbedingt aus den tieferen Regionen des Bronchialsystems, sondern aus dem oberen Respirationstrakt (Pharynx) stammten, so daß in den Proben mit großer Wahrscheinlichkeit keine malignen Zellen enthalten waren. Eine zytologische Untersuchung dieser Proben konnte aus organisatorischen Gründen nicht durchgeführt werden. Die Sputumgewinnung während der Bronchoskopie hingegen wurde durch eine Sedierung des Patienten zusätzlich erleichtert. Das Vorliegen von Proteasen konnte durch die Alkalische Phosphatase Testung bei allen bis auf einen Patienten ausgeschlossen werden. Möglicherweise enthielten die Sputen oder die Auffanggefäße große Mengen an RNAsen, die nicht vollständig durch die Zugabe des RNase Inhibitors gehemmt werden konnten. Aufgrund der Anstrengung bei der Sekretmobilisierung nahm die Probengewinnung einige Zeit in Anspruch (zwischen 5 min und 20 min). Die Weiterverarbeitung und die Zugabe des RNase Inhibitors erfolgte zwar so schnell wie möglich nach der Sekretgewinnung, jedoch war der Patient während des Zeitraums der Sputumgewinnung ohne Beobachtung, so daß nicht darauf geachtet werden konnte, daß das Innere des Auffanggefäßes RNAsen frei blieb. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß in dieser Zeit vorhandene RNAsen die Aktivität der Telomerase durch allmähliche Zerstörung ihrer RNA-Untereinheit herabgesetzt haben könnten.

Das auf diese Weise minimal-invasiv gewonnene Patientenmaterial eignet sich nicht für die Untersuchung auf Telomeraseaktivität zum Beispiel im Rahmen eines Screenings. Im

Gegensatz hierzu können Sputumproben, die mit vorausgehender Sekretprovokation durch Inhalation mit Kochsalzlösung parallel während einer routinemäßigen Bronchoskopie zusammen mit einer Lavage gewonnen werden, bei gleichzeitiger Untersuchung von Sputum und Lavage zu einer Erhöhung der Sicherheit der zytologischen Diagnose beitragen.

4.2.3 Pleura- und Aszitespunktionen

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pleura- und Aszitespunktionen wurden bis auf einen Fall (P 6) immer von dem selben Arzt gewonnen. Dieser besaß eine große Punktionserfahrung. Das hatte den Vorteil, daß die Punktionen sehr zügig verliefen, er gut über die kühle Zwischenlagerung der Proben informiert war, dies immer einhielt und auch das zuständige Labor schnell verständigt wurde. Bei P 6 konnte die Probe aber ebenfalls sofort auf Eis gelagert und weiterverarbeitet werden.

Ein Nachteil bei diesen Punktionen war, daß sie - zwar in unterschiedlicher Menge aber immer deutlich sichtbar - Erythrozyten enthielten, so daß alle Proben dem Waschschrift mit RCLB und hypertoner Lösung unterzogen werden mußten. Es bestand also immer die Gefahr, daß durch diesen Waschschrift nicht nur Zeit, sondern auch Zellen verloren gingen. Besaß eine Probe insgesamt bereits nur sehr wenig Zellen als Ausgangsmaterial, so war der Verlust an Zellen durch den Waschschrift anteilmäßig groß, so daß nur von einer noch geringeren Zahl von Zellen ein Proteinextrakt hergestellt werden konnte. Dies war bei den Proben P 1, A 1 und A 6 der Fall. Bei diesen Extrakten konnte keine Telomeraseaktivität trotz maligner Grunderkrankung festgestellt werden. Allerdings konnte ein zytologischer Befund bei diesen Patienten nicht ausfindig gemacht werden, so daß nicht sichergestellt ist, ob die Punktate wirklich maligne Zellen enthielten.

Bei den Proteinextrakten der Proben A 1 und A 6 handelte es sich um die einzigen beiden Aszitesproben ohne Telomeraseaktivität. Von allen Aszitespunktionen konnten bei 4 von 6 Proben Telomeraseaktivität festgestellt werden. Dabei waren alle untersuchten Patienten Träger maligner Tumoren. Der Patient, von dem die Probe A 1 stammte, wurde innerhalb weniger Tage noch zwei weitere Male punktiert und die daraus gewonnenen Proteinextrakte mit dem TRAP-Assay untersucht. Dabei konnte in den beiden nachfolgenden Punktionen eine deutliche Aktivität der Telomerase detektiert werden (siehe Abbildung 3-13, Proben A 2 und A 3). Dabei war bei diesen Punktionen deutlich sichtbar mehr Zellen enthalten. Auch der Patient der Probe A 6 war bereits vorher punktiert und auf Telomeraseaktivität untersucht worden. Dabei war im Proteinextrakt dieser ersten Punktion (A 5) aber nicht im Extrakt A 6

eine Aktivität der Telomerase verzeichnet worden.

Bei der Pleurapunktionsprobe P 1 handelte es sich um eine von zwei Proben (P 1 und P 2), deren TRAP-Ergebnis den zytologischen Befund nicht bestätigte. Wie bereits erwähnt, enthielt die Probe P 1 von Anfang an nur sehr wenige Zellen. Eventuell waren in dieser Punktionsprobe zwar vor dem Waschvorgang, jedoch nicht mehr danach maligne Zellen enthalten. Ein zytologischer Befund, der aber für die Probe P 1 nicht ausfindig gemacht werden konnte, hätte wertvolle Informationen hierzu liefern können. Die Abwesenheit der Telomeraseaktivität könnte auf eine geringe Zellzahl in der Probe vor und nach dem Waschschrift zurückzuführen sein. Es bleibt aber ungeklärt, warum in der Probe P 2 keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden konnte.

Bei besonders bluthaltigen Proben konnten auch mit Hilfe einer dreifachen Wiederholung des Waschschriftes nicht alle Erythrozyten aus dem Zellmaterial entfernt werden. Diese Erythrozyten waren meist in zähem Mucus verfangen. Auch eine Behandlung mit ACC konnte diesen Zustand nicht verbessern. Die entsprechenden Proteinextrakte waren ebenfalls gelb bis rötlich verfärbt. Aufgrund dieser Verfärbung konnte bei der Überprüfung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase keine Aussage über die Aktivität dieses Enzyms und somit über die Extraktqualität getroffen werden. Der hierbei angewandte Assay beruhte auf einem Farbumschlag und einer darauffolgenden Absorptionsänderung, mit der die Eigenfarbe des Extraktes zu stark interferierte und das Ergebnis verfälschte. Obgleich Hämoglobin die *Taq*-DNA-Polymerase hemmen kann, konnte in dieser Arbeit bei allen betroffenen Proben mit blutiger Verfärbung des Proteinextraktes Telomeraseaktivität mit Hilfe des TRAP-Assays festgestellt werden (A 4, A 5 und PK 6, siehe zu letzterer Probe Kapitel 4.2.4). Genau diese Proben enthielten reichlich Ausgangszellmaterial. Die Grundaktivität an Telomerase kann so groß gewesen sein, daß auch eine mögliche partielle Hemmung der *Taq*-DNA-Polymerase den Nachweis dieser Telomeraseaktivität durch den TRAP-Assay nicht verhinderte. Trotzdem konnte nicht mit definitiver Sicherheit gesagt werden, ob es sich nicht doch um Artefakte handeln könnte. Bei der Probe PK 6 wurden bei der zytologischen Untersuchung keine Tumorzellen gefunden. Bei den Aszitespunktionen A 4 und A 5 wiederum war kein zytologischer Befund auffindbar, obgleich gesichert war, daß bei diesen Patienten maligne Grunderkrankungen vorlagen. Der Patient der Probe A 5 hatte ein Non-Hodgkin-Lymphom. So könnten in der Probe auch aus dem Blut stammende Lymphomzellen enthalten gewesen sein, die beim TRAP-Assay zum Nachweis der Telomeraseaktivität geführt haben könnten. Um dies näher zu deuten, ist aber ein

zytologischer Befund unerlässlich.

Unter Berücksichtigung dieser Diskussionspunkte zeigt sich, daß sich sowohl Pleura- als auch Aszitespunktionen für die Untersuchung auf Telomerase mit Hilfe des TRAP-Assays eignen. Es deutet sich ein Zusammenhang zwischen Grunderkrankung, zytologischem Befund (soweit vorhanden) und dem Nachweis der Telomeraseaktivität an. Dabei konnte die Aktivität dieses Enzyms nicht bei entzündlichen Erkrankungen wie zum Beispiel Bronchitis oder Pneumonie hingegen aber bei malignen Tumorerkrankungen festgestellt werden. Die Aktivität der Telomerase scheint ein Nachweiskriterium für maligne Zellen in den untersuchten Proben zu sein und könnte zur Festigung der zytologischen Diagnose beitragen. Um allerdings eine sichere Aussage treffen zu können, muß eine größere Probenzahl gesammelt und untersucht werden.

4.2.4 Perikardpunktionen

Diese Punktionsproben mußten wie die Pleura- und Aszitespunktionen ebenfalls dem RCLB-Waschschritt unterzogen werden, so daß auch hier die Gefahr des Zellverlustes bestand. Auf das Problem des Zurückbleibens von Erythrozyten in der Probe PK 6 hinsichtlich der Alkalischen Phosphatase Aktivitätsbestimmung sowie der möglichen Hemmung der *Taq*-DNA-Polymerase beim TRAP-Assay wurde bereits in Kapitel 4.2.3 hingewiesen. Obwohl in der zytologischen Untersuchung dieser Probe keine Tumorzellen festgestellt wurden, konnte trotz der Anwesenheit von Hämoglobin Telomeraseaktivität detektiert werden. Dabei war die Grunderkrankung dieses Patienten nicht bekannt. So wäre es durchaus möglich, daß bei der zytologischen Begutachtung der Probe PK 6 keine malignen Zellen gesehen worden waren, ihre Anwesenheit aber durch die Aktivität der Telomerase nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse der Telomeraseaktivität in den untersuchten Perikardpunktionen wiesen auf einen engen Zusammenhang zwischen der Aktivität des Enzyms und dem Vorliegen maligner Zellen hin. Von vier Proben mit Verdacht auf oder sicher nachgewiesenen malignen Zellen bei der zytologischen Untersuchung konnte bei allen Telomeraseaktivität gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurden bei drei Proben ohne zytologisch diagnostizierte Tumorzellen mit Ausnahme einer (PK 6) bei keiner weiteren Probe Telomeraseaktivität festgestellt. Auch die Anwesenheit von Lymphozyten interferierte nicht mit dem TRAP-Assay und führte bei den Untersuchungen für diese Arbeit nicht zu einem Nachweis der Telomerase in Proben ohne malignen Zellanteil.

Beim Vergleich der TRAP-Assays der Perikardpunktionen mit den anderen Punktionsmaterialien fällt auf, daß bei den Perikardpunktionen hinsichtlich der Bandenstärke

und Leitergröße deutlich bessere Ergebnisse erzielt wurden, obwohl alle Perikardergüsse deutlich sichtbar mit Blut vermischt waren und so mehrfach dem Waschschrift mit RCLB und hypertoner Lösung unterzogen werden mußten. Dabei muß davon ausgegangen werden, daß bei jedem Waschschrift zusätzlich Zellen verloren gingen.

Aus der bisher untersuchten Anzahl an Perikardpunktionen zeigt sich, daß sie sich besonders gut für die Anwendung im TRAP-Assay eignen. Telomerase könnte eine sinnvolle Ergänzung zur zytologischen Untersuchung bei diesen Proben darstellen und zur besseren Differenzierung zwischen malignen und benignen Perikardergüssen in der klinischen Praxis beitragen. Dies könnte wiederum therapeutische und bessere prognostische Konsequenzen für die Patienten haben. Für eine höhere Aussagekraft müssen auch hier mehr Proben untersucht werden.

4.2.5 Blutproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei AML Proben mit dem TRAP-Assay untersucht. Dabei konnte bei beiden Proben im Gegensatz zur untersuchten Normalkontrolle (21jährige gesunde Patientin) Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Mit dieser geringen Probenzahl lassen sich keine sicheren Aussagen treffen. Es sollte überprüft werden, ob der TRAP-Assay auch auf diese sehr einfach zu gewinnenden Patientenproben anwendbar ist. Es ist bekannt, daß auch normale Leukozyten eine gewisse Aktivität der Telomerase vorweisen (COUNTER et al. 1995). So deutet sich aber nach der Untersuchung dieser drei Proben an, daß nur Leukozytenproben mit malignen Zellanteilen im Gegensatz zu normalen Leukozyten bei der Untersuchung mit dem in dieser Arbeit angewendeten TRAP-Assay Telomeraseaktivität aufweisen. Der Assay könnte auch hier zur Unterscheidung zwischen Proben mit und ohne malignen Zellanteilen beitragen. Umgekehrt besitzen allerdings Patienten mit einer AML eine größere Menge an Leukozyten pro Blutvolumen als Gesunde. Diese Mehrzahl an Zellen mit einer Grundaktivität an Telomerase und nicht unbedingt die malignen Zellen alleine könnte die Detektion von Telomeraseaktivität durch den TRAP-Assay erklären. Blutproben und ihrer Aufarbeitung mit dem RCLB-Waschschrift scheinen für die Untersuchung mit Hilfe des TRAP-Assays geeignet zu sein. Ein weiteres Anwendungsgebiet für den TRAP-Assay mit Blutproben könnte auch der Nachweis hämatogen metastasierender Tumorzellen im peripheren Blut sein (STRAUME & AKSLEN 1996). Dabei ist die Probengewinnung besonders einfach. Die Venenpunktion wird im klinischen Alltag täglich durchgeführt und birgt auch aus diesem Grund wenig Gefahren für den Patienten. Trotzdem wird für weiterführende Aussagen die Testung vieler Blutproben erforderlich sein.

5 Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen sind in den Industrieländern der heutigen Zeit die zweithäufigste Todesursache des Menschen. Die möglichst frühzeitige Erkennung der Erkrankung spielt eine wichtige Rolle in der Krebstherapie, weil nur eine frühe Behandlung die Prognose und Heilungschancen verbessert.

Neben den herkömmlichen Methoden der Früherkennung, wie zum Beispiel bildgebende Verfahren, versucht man mit unterschiedlichen molekularbiologischen Markern die Krebsdiagnostik stark zu verbessern. Um diese Marker im klinischen Alltag einsetzen zu können, müssen sie mittels valider und sensitiver Methoden in Patientenproben bestimmbar sein, die sich möglichst einfach, schnell und patientenschonend gewinnen lassen. Dafür eignen sich insbesondere Körperflüssigkeiten, die minimalinvasiv gewonnen werden können oder bei routinemäßig durchgeführten Untersuchungen (wie zum Beispiel Bronchoskopien) als Nebenprodukte anfallen.

Das Enzym »*Telomerase*« wird in diesem Rahmen als molekularer Marker untersucht. Es ist ein Multiproteinkomplex mit einer RNA-Untereinheit und ist in der Lage, die Telomere - das heißt die Enden der Chromosomen - mittels reverser Transkription um die telomerischen Repeats 3'-[TTAGGG] zu verlängern. Es wirkt so dem Endreplikationsproblem entgegen, aufgrund dessen sich die Chromosomen bei jeder Zellteilung verkürzen. Telomeraseaktivität liegt in fetalen Zellen, allen Stammzellen, einigen wenigen somatischen Zellarten wie zum Beispiel in aktivierten Lymphozyten und in maligne transformierten Zellen vor. Es konnte in 90 % aller Tumorarten nachgewiesen werden, wobei die Aktivierung der Telomerase ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung ist. Aus diesem Grund könnte Telomerase ein molekularer Früherkennungsmarker sein.

Die Messung der Telomeraseaktivität erfolgt auf der Grundlage einer von KIM et al. 1994 entwickelten Methode, die auf PCR basiert. Durch sie kann die Enzymaktivität eines Proteinextraktes semiquantitativ in einem einzigen Reaktionsgefäß nachgewiesen werden. Es handelt sich um den »TRAP-Assay« (»**T**elomeric **R**epeat **A**mplification **P**rotocol«).

Der ursprüngliche, durch KIM et al. 1994 beschriebene TRAP-Assay wurde an reinem Tumorgewebe entwickelt und kann die Aktivität der Telomerase in höchstens 100 Tumorzellen nachweisen. Ziel dieser Arbeit war es zunächst, einen TRAP-Assay zu etablieren und so weit zu optimieren und sensitivieren, daß der Nachweis der Telomeraseaktivität in einem heterogenen Zellgemisch wie in Körperflüssigkeiten mit geringsten Mengen an malignen Zellen (circa 10) möglich wurde. Der Assay sollte in klinischen Routinelabors mit durchschnittlicher Ausstattung mit großer Sensitivität und Validität durchgeführt werden können.

Die Optimierung des TRAP-Assays gestaltete sich äußerst schwierig, weil er zusätzlich durch die schwankende Zellzahl in den Proben beeinflusst wurde. Auf die Problematik des TRAP-

Assays als Methode wird in dieser Arbeit im Detail eingegangen. In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die Eignung verschiedener Körperflüssigkeiten in der Anwendung im optimierten TRAP-Assay zur Bestimmung der Aktivität der Telomerase im klinischen Alltag überprüft. Aus diesem Grund wurden bronchoskopisch gewonnene Sputen und Lavagen, Sputen von Patienten mit Bronchialkarzinom auf Station, Pleura-, Aszites-, Perikardpunktionen und peripheres Blut mit dem optimierten TRAP-Assay auf Telomeraseaktivität untersucht.

Bei den von 33 Patienten bronchoskopisch gewonnenen Sputen und Lavagen zeigte sich, daß sie sich gut für die Untersuchung durch den TRAP-Assay eigneten. Bei gleichzeitiger Untersuchung beider Probenarten konnte ein enger Zusammenhang zwischen histopathologischer Diagnose und Bestimmung der Telomeraseaktivität nachgewiesen werden (6 Patienten mit Telomeraseaktivität von 8 Patienten mit malignem Tumor und verwertbaren Proben, 22 Telomerase-negative von 23 Patienten ohne Malignität und verwertbaren Proben). Sowohl die Pleurapunktionen (n=7), Aszitespunktionen (n=6), Perikardpunktionen (n=7) als auch das periphere Blut (n=3) - nicht aber die Sputen von Patienten mit Bronchialkarzinom auf Station (n=5) - eigneten sich sehr gut für die Anwendung im TRAP-Assay, wobei sich ein enger Zusammenhang zwischen Grunderkrankung bzw. dem zytologischen Befund und der nachgewiesenen Telomeraseaktivität zeigte.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit geben Hinweise darauf, daß der zusätzliche Nachweis der Aktivität der Telomerase durch den optimierten TRAP-Assay in Zukunft bei den oben erwähnten Proben die zytologischen Befunde unterstützen und erweitern könnte. Um genauere Aussagen über die Sensitivität machen zu können, muß aber noch eine größere Probenzahl untersucht werden.

Gleichzeitig wurde in dieser Arbeit aber auch die Störanfälligkeit und methodische Komplexität des TRAP-Assays deutlich, was die Durchführung dieser Methode in Routinelabors stark erschwert. Die Anwendung des TRAP-Assays könnte aus diesen Gründen einigen wenigen Speziallabors vorbehalten bleiben.

6 Abkürzungen

AML	akute myeloische Leukämie
<i>bcl2</i>	B-Cell Lymphoma Gen 2
bp	Basenpaare
CLL	chronische lymphatische Leukämie
<i>c-myc</i>	humanes Onkogen (Homolog zu Onkogen aus MC29 avian myelocytomatosis virus)
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CpG-Inseln	Cytosin-poly-Guanin Inseln
CT	Computertomographie
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GH-RH	Growth Hormone Releasing Hormone
HeLa-Zellen	Stamm menschlicher Zervixkarzinomzellen benannt nach der amerikanischen Spenderin <i>Helen Lane</i>
hTAP1	humanes Telomerase-assoziiertes Protein 1
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase Einheit
hTR	humane Telomerase RNA
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
ML	Mittellappen (der rechten Lunge)
MRT	Magnetresonanztomographie
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NSCLC	Non-Small-Cell-Lung-Cancer (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
OL	Oberlappen der Lunge
RB	Retinoblastomgen
rpm	rotations per minute
SCLC	Small-Cell-Lung-Cancer (kleinzelliges Lungenkarzinom)
SV-40	Simian virus 40
TEIPP1	Telomerase inhibierendes Polypeptid 1
TIN2	TRF1-interacting nuclear protein 2
TRF1/2	telomeric repeat binding factor 1/2
UL	Unterlappen der Lunge
UV	ultraviolett
<i>v-K_T-ras</i>	V irusonkogen aus K irsten murine sarcoma virus (auch rat sarcoma virus)
V.a.	Verdacht auf
Vol	Volumen
Z.n.	Zustand nach

7 Literaturverzeichnis

- ABU AL-SOUD, W. AND RADSTROM, P., Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol*, 1998. 64(10): p. 3748-53.
- AL-SOUD, W.A., JONSSON, L.J. AND RADSTROM, P., Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(1): p. 345-50.
- ALLSHIRE, R.C., DEMPSTER, M. AND HASTIE, N.D., Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res*, 1989. 17(12): p. 4611-27.
- ALLSOPP, R.C., VAZIRI, H., PATTERSON, C., GOLDSTEIN, S., YOUNGLAI, E.V., FUTCHER, A.B., GREIDER, C.W. AND HARLEY, C.B., Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(21): p. 10114-8.
- AVILION, A.A., PIATYSZEK, M.A., GUPTA, J., SHAY, J.W., BACCHETTI, S. AND GREIDER, C.W., Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res*, 1996. 56(3): p. 645-50.
- BACHAND, F. AND AUTEXIER, C., Functional regions of human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA required for telomerase activity and RNA-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.*, 2001. 21: p. 1888-1897.
- BACHAND, F., TRIKI, I. AND AUTEXIER, C., Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucl Acids Res*, 2001. 29(16): p. 3385-3393.
- BASS, H.W., MARSHALL, W.F., SEDAT, J.W., AGARD, D.A. AND CANDE, W.Z., Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three- dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *Curr Biol*, 1997. 7(12): p. 930-9.
- BEATTIE, T.L., ZHOU, W., ROBINSON, M.O. AND HARRINGTON, L., Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol*, 1998. 8(3): p. 177-80.
- BESTILNY, L.J., BROWN, C.B., MIURA, Y., ROBERTSON, L.D. AND RIABOWOL, K.T., Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. *Cancer Res*, 1996. 56(16): p. 3796-802.
- BHATTACHARYYA, A. AND BLACKBURN, E.H., A functional telomerase RNA swap in vivo reveals the importance of nontemplate RNA domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(7): p. 2823-7.
- BIANCHI, A., SMITH, S., CHONG, L., ELIAS, P. AND DE LANGE, T., TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *Embo J*, 1997. 16(7): p. 1785-94.
- BILAUD, T., BRUN, C., ANCELIN, K., KOERING, C.E., LAROCHE, T. AND GILSON, E., Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet*, 1997. 17(2): p. 236-9.
- BLACKBURN, E.H. AND GALL, J.G., A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*, 1978. 120(1): p. 33-53.
- BLACKBURN, E.H., Telomeres and their synthesis. *Science*, 1990. 249(4968): p. 489-90.

- BLANKS, R.G., MOSS, S.M., MCGAHAN, C.E., QUINN, M.J. AND BABB, P.J., Effect of NHS breast screening programme on mortality from breast cancer in England and Wales, 1990-8: comparison of observed with predicted mortality. *Bmj*, 2000. 321(7262): p. 665-669.
- BLASCO, M.A., FUNK, W., VILLEPONTEAU, B. AND GREIDER, C.W., Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science*, 1995. 269(5228): p. 1267-70.
- BODNAR, A.G., OUELLETTE, M., FROLKIS, M., HOLT, S.E., CHIU, C.P., MORIN, G.B., HARLEY, C.B., SHAY, J.W., LICHTSTEINER, S. AND WRIGHT, W.E., Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [see comments]. *Science*, 1998. 279(5349): p. 349-52.
- BRESLOW, R.A., SHAY, J.W., GAZDAR, A.F. AND SRIVASTAVA, S., Telomerase and early detection of cancer: a National Cancer Institute workshop. *J Natl Cancer Inst*, 1997. 89(9): p. 618-23.
- BROCCOLI, D., SMOGORZEWSKA, A., CHONG, L. AND DE LANGE, T., Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*, 1997. 17(2): p. 231-5.
- BRYAN, T.M., ENGLEZOU, A., GUPTA, J., BACCHETTI, S. AND REDDEL, R.R., Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J*, 1995. 14(17): p. 4240-8.
- BRYAN, T.M., ENGLEZOU, A., DALLA-POZZA, L., DUNHAM, M.A. AND REDDEL, R.R., Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines [see comments]. *Nat Med*, 1997. 3(11): p. 1271-4.
- BRYAN, T.M., MARUSIC, L., BACCHETTI, S., NAMBA, M. AND REDDEL, R.R., The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum Mol Genet*, 1997. 6(6): p. 921-6.
- BUCHKOVICH, K.J. AND GREIDER, C.W., Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells. *Mol Biol Cell*, 1996. 7(9): p. 1443-54.
- BURGER, A.M., FIEBIG, H.H., KUETTEL, M.R., LAUTENBERGER, J.A., KUNG, H.F. AND RHIM, J.S., Effect of oncogene expression on telomerase activation and telomere length in human endothelial, fibroblast and prostate epithelial cells. *Int J Oncol*, 1998. 13(5): p. 1043-8.
- CHEN, J., BLASCO, M. AND GREIDER, C., Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*, 2000. 100(5): p. 503.
- CHONG, L., VAN STEENSEL, B., BROCCOLI, D., ERDJUMENT-BROMAGE, H., HANISH, J., TEMPST, P. AND DE LANGE, T., A human telomeric protein. *Science*, 1995. 270(5242): p. 1663-7.
- COLGIN, L.M. AND REDDEL, R.R., Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization [published erratum appears in *Curr Opin Genet Dev* 1999 Apr;9(2):247]. *Curr Opin Genet Dev*, 1999. 9(1): p. 97-103.
- CONG, Y.S., WEN, J. AND BACCHETTI, S., The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet*, 1999. 8(1): p. 137-42.
- COOPER, J.P., WATANABE, Y. AND NURSE, P., Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination [see comments]. *Nature*, 1998. 392(6678): p. 828-31.
- COUNTER, C.M., GUPTA, J., HARLEY, C.B., LEBER, B. AND BACCHETTI, S., Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood*, 1995. 85(9): p. 2315-20.
- COUNTER, C.M., HAHN, W.C., WEI, W., CADDLE, S.D., BEIJERSBERGEN, R.L., LANSBORP, P.M., SEDIVY, J.M. AND WEINBERG, R.A., Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(25): p. 14723-8.
- CROSS, S.H., ALLSHIRE, R.C., MCKAY, S.J., MCGILL, N.I. AND COOKE, H.J., Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature*, 1989. 338(6218): p. 771-4.

- CUTHBERT, A.P., BOND, J., TROTT, D.A., GILL, S., BRONI, J., MARRIOTT, A., KHOUDOLI, G., PARKINSON, E.K., COOPER, C.S. AND NEWBOLD, R.F., Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells [see comments]. *J Natl Cancer Inst*, 1999. 91(1): p. 37-45.
- DALLAIRE, F., DUPUIS, S., FISET, S. AND CHABOT, B., Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UP1 protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication in vitro. *J Biol Chem*, 2000. 275: p. 14509-14516.
- DE LANGE, T., Ending up with the right partner [news; comment]. *Nature*, 1998. 392(6678): p. 753-4.
- DENG, G., CHEN, A., HONG, J., CHAE, H.S. AND KIM, Y.S., Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res*, 1999. 59(9): p. 2029-33.
- DEVEREUX, T.R., HORIKAWA, I., ANNA, C.H., ANNAB, L.A., AFSHARI, C.A. AND BARRETT, J.C., DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res*, 1999. 59(24): p. 6087-90.
- DUDHAT, S.B., MISTRY, R.C., VARUGHESE, T., FAKIH, A.R. AND CHINYOY, R.F., Prognostic factors in head and neck soft tissue sarcomas. *Cancer*, 2000. 89(4): p. 868-72.
- FENG, J., FUNK, W.D., WANG, S.S., WEINRICH, S.L., AVILION, A.A., CHIU, C.P., ADAMS, R.R., CHANG, E., ALLSOPP, R.C., YU, J., The RNA component of human telomerase. *Science*, 1995. 269(5228): p. 1236-41.
- FONTANA, T., SANDERSON, D.R., WOOLNER, L.B., MILLER, W.E., BERNATZ, P.E., PAYNE, W.S. AND TAYLOR, W.F., The Mayo Lung Project for early detection and localization of bronchogenic carcinoma: a status report. *Chest*, 1975. 67(5): p. 511-22.
- FORD, L., SUH, J., WRIGHT, W. AND SHAY, J., Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2 associate with the RNA component of human telomerase. *Mol Cell Biol*, 2000. 20: p. 9084-9091.
- FRANKS, L.M. AND TEICH, N.M., *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991.
- FU, W., BEGLEY, J.G., KILLEN, M.W. AND MATTSON, M.P., Anti-apoptotic role of telomerase in pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*, 1999. 274(11): p. 7264-71.
- FUJIMOTO, K. AND TAKAHASHI, M., Telomerase activity in human leukemic cell lines is inhibited by antisense pentadecadeoxynucleotides targeted against c-myc mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 241(3): p. 775-81.
- GILLEY, D. AND BLACKBURN, E.H., The telomerase RNA pseudoknot is critical for the stable assembly of a catalytically active ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999. 96: p. 6621-6625.
- GOLLAHON, L.S. AND SHAY, J.W., immortalization of human mammary epithelial cells transfected with mutant p53 (273his). *Oncogene*, 1996. 12(4): p. 715-25.
- GONZALEZ-ZULUETA, M., BENDER, C.M., YANG, A.S., NGUYEN, T., BEART, R.W., VAN TORNOUT, J.M. AND JONES, P.A., Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res*, 1995. 55(20): p. 4531-5.
- GREENBERG, R.A., ALLSOPP, R.C., CHIN, L., MORIN, G.B. AND DEPINHO, R.A., Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*, 1998. 16(13): p. 1723-30.
- GREENE, E.C. AND SHIPPEN, D.E., Developmentally programmed assembly of higher order telomerase complexes with distinct biochemical and structural properties. *Genes Dev*, 1998. 12(18): p. 2921-31.
- GREIDER, C.W. AND BLACKBURN, E.H., Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 1985. 43(2 Pt 1): p. 405-13.
- GREIDER, C.W. AND BLACKBURN, E.H., A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 1989. 337(6205): p. 331-7.

- GREILING, H. AND GRESSNER, A.M., Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer, Stuttgart, New York, 1995. 3: p. 594.
- GRIFFITH, J., BIANCHI, A. AND DE LANGE, T., TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J Mol Biol*, 1998. 278(1): p. 79-88.
- GRIFFITH, J.D., COMEAU, L., ROSENFELD, S., STANSEL, R.M., BIANCHI, A., MOSS, H. AND DE LANGE, T., Mammalian telomeres end in a large duplex loop [see comments]. *Cell*, 1999. 97(4): p. 503-14.
- HAHN, W.C., STEWART, S.A., BROOKS, M.W., YORK, S.G., EATON, E., KURACHI, A., BEIJERSBERGEN, R.L., KNOLL, J.H., MEYERSON, M. AND WEINBERG, R.A., Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells [see comments]. *Nat Med*, 1999. 5(10): p. 1164-70.
- HAHN, W.C., COUNTER, C.M., LUNDBERG, A.S., BEIJERSBERGEN, R.L., BROOKS, M.W. AND WEINBERG, R.A., Creation of human tumour cells with defined genetic elements [see comments]. *Nature*, 1999. 400(6743): p. 464-8.
- HARLEY, C.B., FUTCHER, A.B. AND GREIDER, C.W., Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990. 345(6274): p. 458-60.
- HARLEY, C.B., Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res*, 1991. 256(2-6): p. 271-82.
- HARRINGTON, L., ZHOU, W., MCPHAIL, T., OULTON, R., YEUNG, D.S., MAR, V., BASS, M.B. AND ROBINSON, M.O., Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev*, 1997. 11(23): p. 3109-15.
- HARRINGTON, L., MCPHAIL, T., MAR, V., ZHOU, W., OULTON, R., BASS, M.B., ARRUDA, I. AND ROBINSON, M.O., A mammalian telomerase-associated protein [see comments]. *Science*, 1997. 275(5302): p. 973-7.
- HARRISON, T.R., FAUCI, A.S., BRAUNWALD, E., ISSELBACHER, K.J., WILSON, J.D., MARTIN, J.B., KASPER, D.L., HAUSER, S.L. AND LONGO, D.L.E., Principles of Internal Medicine. 1998. 14.
- HASTIE, N.D., DEMPSTER, M., DUNLOP, M.G., THOMPSON, A.M., GREEN, D.K. AND ALLSHIRE, R.C., Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing [see comments]. *Nature*, 1990. 346(6287): p. 866-8.
- HATHCOCK, K.S., WENG, N.P., MERICA, R., JENKINS, M.K. AND HODES, R., Cutting edge: antigen-dependent regulation of telomerase activity in murine T cells. *J Immunol*, 1998. 160(12): p. 5702-6.
- HAYFLICK, L., The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1965. 37: p. 614-36.
- HEINE, B., HUMMEL, M., MULLER, M., HEICAPPELL, R., MILLER, K. AND STEIN, H., Non-radioactive measurement of telomerase activity in human bladder cancer, bladder washings, and in urine. *J Pathol*, 1998. 184(1): p. 71-6.
- HENDERSON, E.R. AND BLACKBURN, E.H., An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol Cell Biol*, 1989. 9(1): p. 345-8.
- HERBERT, B., PITTS, A.E., BAKER, S.I., HAMILTON, S.E., WRIGHT, W.E., SHAY, J.W. AND COREY, D.R., Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(25): p. 14276-81.
- HIYAMA, K.I., HIRAI, Y., KYOIZUMI, S., AKIYAMA, M., HIYAMA, E., PIATYSZEK, M.A., SHAY, J.W., ISHIOKA, S. AND YAMAKIDO, M., Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol*, 1995. 155(8): p. 3711-5.
- HIYAMA, E., GOLLAHON, L., KATAOKA, T., KUROI, K., YOKOYAMA, T., GAZDAR, A.F., HIYAMA, K., PIATYSZEK, M.A. AND SHAY, J.W., Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst*, 1996. 88(2): p. 116-22.
- HOLT, S.E., WRIGHT, W.E. AND SHAY, J.W., Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(6): p. 2932-9.

- HOLT, S.E., AISNER, D.L., BAUR, J., TESMER, V.M., DY, M., OUELLETTE, M., TRAGER, J.B., MORIN, G.M., TOFT, D.O., SHAY, J.W., WRIGHT, W.E. AND WHITE, M.A., Functional requirement of p23 and Hsp 90 in telomerase complexes. *Genes Dev.*, 1999. 13: p. 817-826.
- HORIKAWA, I., OSHIMURA, M. AND BARRETT, J.C., Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence. *Mol Carcinog*, 1998. 22(2): p. 65-72.
- HORIKAWA, I., CABLE, P.L., AFSHARI, C. AND BARRETT, J.C., Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res*, 1999. 59(4): p. 826-30.
- HU, B.T., LEE, S.C., MARIN, E., RYAN, D.H. AND INSEL, R.A., Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro. *J Immunol*, 1997. 159(3): p. 1068-71.
- HYEON JOO, O., HANDE, M.P., LANSBORP, P.M. AND NATARAJAN, A.T., Induction of telomerase activity and chromosome aberrations in human tumour cell lines following X-irradiation. *Mutat Res*, 1998. 401(1-2): p. 121-31.
- IGARASHI, H. AND SAKAGUCHI, N., Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood*, 1997. 89(4): p. 1299-307.
- KALLASSY, M., MARTEL, N., DAMOUR, O., YAMASAKI, H. AND NAKAZAWA, H., Growth arrest of immortalized human keratinocytes and suppression of telomerase activity by p21WAF1 gene expression. *Mol Carcinog*, 1998. 21(1): p. 26-36.
- KANG, S.S., KWON, T., KWON, D.Y. AND DO, S.I., Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem*, 1999. 274(19): p. 13085-90.
- KARLSEDER, J., BROCCOLI, D., DAI, Y., HARDY, S. AND DE LANGE, T., p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science*, 1999. 283(5406): p. 1321-5.
- KIARIS, H. AND SCHALLY, A.V., Decrease in telomerase activity in U-87MG human glioblastomas after treatment with an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(1): p. 226-31.
- KILIAN, A., BOWTELL, D.D., ABUD, H.E., HIME, G.R., VENTER, D.J., KEESE, P.K., DUNCAN, E.L., REDDEL, R.R. AND JEFFERSON, R.A., Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet*, 1997. 6(12): p. 2011-9.
- KIM, N.W., PIATYSZEK, M.A., PROWSE, K.R., HARLEY, C.B., WEST, M.D., HO, P.L., COVIELLO, G.M., WRIGHT, W.E., WEINRICH, S.L. AND SHAY, J.W., Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [see comments]. *Science*, 1994. 266(5193): p. 2011-5.
- KIM, N.W. AND WU, F., Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(13): p. 2595-7.
- KIM, S.H., KAMINKER, P. AND CAMPISI, J., TIN2, a new regulator of telomere length in human cells [see comments]. *Nat Genet*, 1999. 23(4): p. 405-12.
- KIRK, K.E., HARMON, B.P., REICHARDT, I.K., SEDAT, J.W. AND BLACKBURN, E.H., Block in anaphase chromosome separation caused by telomerase template mutation. *Science*, 1997. 275: p. 1478-81.
- KIYONO, T., FOSTER, S.A., KOOP, J.I., MCDUGALL, J.K., GALLOWAY, D.A. AND KLINGELHUTZ, A.J., Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells [see comments]. *Nature*, 1998. 396(6706): p. 84-8.
- KLINGELHUTZ, A.J., FOSTER, S.A. AND MCDUGALL, J.K., Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 1996. 380(6569): p. 79-82.

- KLOBUTCHER, L.A., SWANTON, M.T., DONINI, P. AND PRESCOTT, D.M., All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(5): p. 3015-9.
- KOLQUIST, K.A., ELLISEN, L.W., COUNTER, C.M., MEYERSON, M., TAN, L.K., WEINBERG, R.A., HABER, D.A. AND GERALD, W.L., Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues [see comments]. *Nat Genet*, 1998. 19(2): p. 182-6.
- KONDO, S., TANAKA, Y., KONDO, Y., HITOMI, M., BARNETT, G.H., ISHIZAKA, Y., LIU, J., HAQQI, T., NISHIYAMA, A., VILLEPONTEAU, B., COWELL, J.K. AND BARNA, B.P., Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation. *Faseb J*, 1998. 12(10): p. 801-11.
- KRUPP, G., KUHNE, K., TAMM, S., KLAPPER, W., HEIDORN, K., ROTT, A. AND PARWARESCH, R., Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(4): p. 919-21.
- KYO, S., KANAYA, T., TAKAKURA, M., TANAKA, M. AND INOUE, M., Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer*, 1999. 80(1): p. 60-3.
- LABRANCHE, H., DUPUIS, S., BEN-DAVID, Y., BANI, M., WELLINGER, R. AND CHABOT, B., Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nature Genetics*, 1998. 19: p. 199-202.
- LAIRD, P.W. AND JAENISCH, R., The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet*, 1996. 30: p. 441-64.
- LAND, H., PARADA, L.F. AND WEINBERG, R.A., Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, 1983. 304(5927): p. 596-602.
- LANDIS, S.H., MURRAY, T., BOLDEN, S. AND WINGO, P.A., Cancer statistics, 1999 [see comments]. *CA Cancer J Clin*, 1999. 49(1): p. 8-31, 1.
- LE, S., STERNGLANZ, R. AND GREIDER, C.W., Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell*, 2000. 11(3): p. 999-1010.
- LEE, H.W., BLASCO, M.A., GOTTLIEB, G.J., HORNER, J.W., 2ND, GREIDER, C.W. AND DEPINHO, R.A., Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*, 1998. 392(6676): p. 569-74.
- LETEURTRE, F., LI, X., GLUCKMAN, E. AND CAROSELLA, E.D., Telomerase activity during the cell cycle and in gamma-irradiated hematopoietic cells. *Leukemia*, 1997. 11(10): p. 1681-9.
- LI, H., ZHAO, L.L., FUNDER, J.W. AND LIU, J.P., Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 1997. 272(27): p. 16729-32.
- LI, H., ZHAO, L., YANG, Z., FUNDER, J.W. AND LIU, J.P., Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 1998. 273(50): p. 33436-42.
- LI, H., CAO, Y., BERNDT, M.C., FUNDER, J.W. AND LIU, J.P., Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene*, 1999. 18(48): p. 6785-94.
- LINDSEY, J., MCGILL, N.I., LINDSEY, L.A., GREEN, D.K. AND COOKE, H.J., In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res*, 1991. 256(1): p. 45-8.
- LIU, J.P., Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *Faseb J*, 1999. 13(15): p. 2091-104.
- MAKAROV, V.L., HIROSE, Y. AND LANGMORE, J.P., Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, 1997. 88(5): p. 657-66.
- MANDAL, M. AND KUMAR, R., Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem*, 1997. 272(22): p. 14183-7.

- MCCCLINTOCK, B., The stability of broken ends of chromosomes in *zea mays*. *Genetics*, 1941. 26: p. 234-282.
- MERLO, A., HERMAN, J.G., MAO, L., LEE, D.J., GABRIELSON, E., BURGER, P.C., BAYLIN, S.B. AND SIDRANSKY, D., 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers [see comments]. *Nat Med*, 1995. 1(7): p. 686-92.
- MEYERSON, M., COUNTER, C.M., EATON, E.N., ELLISEN, L.W., STEINER, P., CADDLE, S.D., ZIAUGRA, L., BEIJERSBERGEN, R.L., DAVIDOFF, M.J., LIU, Q., BACCHETTI, S., HABER, D.A. AND WEINBERG, R.A., hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, 1997. 90(4): p. 785-95.
- MITCHELL, J., WOOD, E. AND COLLINS, K., A telomerase component is defective in the human dyskeratosis congenita. *Nature*, 1999. 402: p. 551-555.
- MITCHELL, J.R. AND COLLINS, K., Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell*, 2000. 6: p. 361-371.
- MORALES, C.P., HOLT, S.E., OUELLETTE, M., KAUR, K.J., YAN, Y., WILSON, K.S., WHITE, M.A., WRIGHT, W.E. AND SHAY, J.W., Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet*, 1999. 21(1): p. 115-8.
- MORIN, G.B., The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, 1989. 59(3): p. 521-9.
- MOSS, S., A trial to study the effect on breast cancer mortality of annual mammographic screening in women starting at age 40. Trial Steering Group. *J Med Screen*, 1999. 6(3): p. 144-8.
- MOYZIS, R.K., BUCKINGHAM, J.M., CRAM, L.S., DANI, M., DEAVEN, L.L., JONES, M.D., MEYNE, J., RATLIFF, R.L. AND WU, J.R., A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(18): p. 6622-6.
- MU, X.C., BRIEN, T.P., ROSS, J.S., LOWRY, C.V. AND MCKENNA, B.J., Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids. *Cancer*, 1999. 87(2): p. 93-9.
- MULLER, H.J., The remaking of chromosomes. *The Collecting Net - Woods Hole*, 1938. 13: p. 181-195.
- MULLIS, K.B. AND FALOONA, F.A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987. 155: p. 335-50.
- NAKAMURA, T.M., MORIN, G.B., CHAPMAN, K.B., WEINRICH, S.L., ANDREWS, W.H., LINGNER, J., HARLEY, C.B. AND CECHE, T.R., Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human [see comments]. *Science*, 1997. 277(5328): p. 955-9.
- NAKAYAMA, J., TAHARA, H., TAHARA, E., SAITO, M., ITO, K., NAKAMURA, H., NAKANISHI, T., IDE, T. AND ISHIKAWA, F., Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet*, 1998. 18(1): p. 65-8.
- NIIDA, H., MATSUMOTO, T., SATOH, H., SHIWA, M., TOKUTAKE, Y., FURUICHI, Y. AND SHINKAI, Y., Severe growth defect in mouse cells lacking the telomerase RNA component. *Nat Genet*, 1998. 19(2): p. 203-6.
- NIMMO, E.R., PIDOUX, A.L., PERRY, P.E. AND ALLSHIRE, R.C., Defective meiosis in telomere-silencing mutants of *Schizosaccharomyces pombe* [see comments]. *Nature*, 1998. 392(6678): p. 825-8.
- OHMURA, H., TAHARA, H., SUZUKI, M., IDE, T., SHIMIZU, M., YOSHIDA, M.A., TAHARA, E., SHAY, J.W., BARRETT, J.C. AND OSHIMURA, M., Restoration of the cellular senescence program and repression of telomerase by human chromosome 3. *Jpn J Cancer Res*, 1995. 86(10): p. 899-904.
- OHYASHIKI, J.H., OHYASHIKI, K., SANO, T. AND TOYAMA, K., Non-radioisotopic and semi-quantitative procedure for terminal repeat amplification protocol. *Jpn J Cancer Res*, 1996. 87(4): p. 329-31.

- OHYASHIKI, K., OHYASHIKI, J.H. AND TOYAMA, K., Technical improvement in determining telomerase activity in hematologic neoplasias: a possibility of single cell determination of telomerase activity. *Hum Cell*, 1996. 9(4): p. 295-300.
- OHYASHIKI, K., OHYASHIKI, J.H., NISHIMAKI, J., TOYAMA, K., EBIHARA, Y., KATO, H., WRIGHT, W.E. AND SHAY, J.W., Cytological detection of telomerase activity using an in situ telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res*, 1997. 57(11): p. 2100-3.
- PENNISI, E., A possible new partner for telomerase [news; comment]. *Science*, 1998. 282(5393): p. 1395, 1397.
- POREMB, C., BOCKER, W., WILLENBRING, H., SCHAFER, K.L., OTTERBACH, F., BURGER, H., DIALLO, R. AND DOCKHORN-DWORNICZAK, B., Telomerase activity in human proliferative breast lesions. *Int J Oncol*, 1998. 12(3): p. 641-8.
- RHIM, J.S., TSAI, W.P., CHEN, Z.Q., CHEN, Z., VAN WAES, C., BURGER, A.M. AND LAUTENBERGER, J.A., A human vascular endothelial cell model to study angiogenesis and tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 1998. 19(4): p. 673-81.
- ROY, J., FULTON, T.B. AND BLACKBURN, E.H., Specific telomerase RNA residues distant from the template are essential for telomerase function. *Genes Dev*, 1998. 12(20): p. 3286-300.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. AND ERLICH, H.A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988. 239(4839): p. 487-91.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T., Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- SAVOYSKY, E., YOSHIDA, K., OHTOMO, T., YAMAGUCHI, Y., AKAMATSU, K., YAMAZAKI, T., YOSHIDA, S. AND TSUCHIYA, M., Down-regulation of telomerase activity is an early event in the differentiation of HL60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 226(2): p. 329-34.
- SCHERTHAN, H., WEICH, S., SCHWEGLER, H., HEYTING, C., HARLE, M. AND CREMER, T., Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol*, 1996. 134(5): p. 1109-25.
- SCHNEIDER, P.M., STOELTZING, O., ROTH, J.A., HOELSCHER, A.H., WEGERER, S., MIZUMOTO, S., BECKER, K., DITTLER, H.J., FINK, U. AND SIEWERT, J.R., P53 mutational status improves estimation of prognosis in patients with curatively resected adenocarcinoma in Barrett's esophagus [In Process Citation]. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(8): p. 3153-8.
- SHAMPAY, J., SZOSTAK, J.W. AND BLACKBURN, E.H., DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature*, 1984. 310(5973): p. 154-7.
- SHARMA, H.W., HSIAO, R. AND NARAYANAN, R., Telomerase as a potential molecular target to study G-quartet phosphorothioates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1996. 6(1): p. 3-7.
- SHAY, J.W. AND BACCHETTI, S., A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 1997. 33(5): p. 787-91.
- SHAY, J.W., Toward identifying a cellular determinant of telomerase repression [editorial; comment]. *J Natl Cancer Inst*, 1999. 91(1): p. 4-6.
- SHIPPEN-LENTZ, D. AND BLACKBURN, E.H., Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science*, 1990. 247(4942): p. 546-52.
- SIEGAL, G., TURCHI, J.J., MYERS, T.W. AND BAMBARA, R.A., A 5' to 3' exonuclease functionally interacts with calf DNA polymerase epsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(20): p. 9377-81.
- SMITH, S. AND DE LANGE, T., TRF1, a mammalian telomeric protein. *Trends Genet*, 1997. 13(1): p. 21-6.
- SMITH, S., GIRIAT, I., SCHMITT, A. AND DE LANGE, T., Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres [see comments]. *Science*, 1998. 282(5393): p. 1484-7.

- STRAHL, C. AND BLACKBURN, E.H., Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(1): p. 53-65.
- STRAUME, O. AND AKSLEN, L.A., Independent prognostic importance of vascular invasion in nodular melanomas. *Cancer*, 1996. 78(6): p. 1211-9.
- STRAUSS, G.M., GLEASON, R.E. AND SUGARBAKER, D.J., Chest X-ray screening improves outcome in lung cancer. A reappraisal of randomized trials on lung cancer screening [see comments]. *Chest*, 1995. 107(6 Suppl): p. 270S-279S.
- SUEHARA, N., MIZUMOTO, K., TANAKA, M., NIIYAMA, H., YOKOHATA, K., TOMINAGA, Y., SHIMURA, H., MUTA, T. AND HAMASAKI, N., Telomerase activity in pancreatic juice differentiates ductal carcinoma from adenoma and pancreatitis. *Clin Cancer Res*, 1997. 3(12 Pt 1): p. 2479-83.
- SUMIDA, T., HAMAKAWA, H., SOGAWA, K., SUGITA, A., TANIOKA, H. AND UEDA, N., Telomerase components as a diagnostic tool in human oral lesions. *Int J Cancer*, 1999. 80(1): p. 1-1.
- SUN, D., LOPEZ-GUJARDO, C.C., QUADA, J., HURLEY, L.H. AND VON HOFF, D.D., Regulation of catalytic activity and processivity of human telomerase. *Biochemistry*, 1999. 38(13): p. 4037-44.
- TAKAGI, S., KINOCHI, Y., HIWATASHI, N., CHIDA, M., NAGASHIMA, F., TAKAHASHI, S., NEGORO, K., SHIMOSEGAWA, T. AND TOYOTA, T., Telomere shortening and the clinicopathologic characteristics of human colorectal carcinomas [In Process Citation]. *Cancer*, 1999. 86(8): p. 1431-6.
- TAKAKURA, M., KYO, S., KANAYA, T., HIRANO, H., TAKEDA, J., YUTSUDO, M. AND INOUE, M., Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*, 1999. 59(3): p. 551-7.
- TANAKA, H., SHIMIZU, M., HORIKAWA, I., KUGOH, H., YOKOTA, J., BARRETT, J.C. AND OSHIMURA, M., Evidence for a putative telomerase repressor gene in the 3p14.2-p21.1 region. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998. 23(2): p. 123-33.
- TANGKIJVANICH, P., TRESUKOSOL, D., SAMPATANUKUL, P., SAKDIKUL, S., VORAVUD, N., MAHACHAI, V. AND MUTIRANGURA, A., Telomerase assay for differentiating between malignancy-related and nonmalignant ascites. *Clin Cancer Res*, 1999. 5(9): p. 2470-5.
- TERASAKI, M., KATO, S., SUGITA, Y., SHIGEMORI, M. AND MORIMATSU, M., Adenovirus-mediated over-expression of p21Waf-1 differentially affects the proliferation, telomerase activity, and expression of glial fibrillary acidic protein in human glioma cells. *Int J Oncol*, 1999. 14(1): p. 63-9.
- UEDA, M., OUHTIT, A., BITO, T., NAKAZAWA, K., LUBBE, J., ICHIHASHI, M., YAMASAKI, H. AND NAKAZAWA, H., Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Res*, 1997. 57(3): p. 370-4.
- ULANER, G.A., HU, J.F., VU, T.H., GIUDICE, L.C. AND HOFFMAN, A.R., Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res*, 1998. 58(18): p. 4168-72.
- VAN STEENSEL, B. AND DE LANGE, T., Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1 [see comments]. *Nature*, 1997. 385(6618): p. 740-3.
- VAN STEENSEL, B., SMOGORZEWSKA, A. AND DE LANGE, T., TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, 1998. 92(3): p. 401-13.
- VAZIRI, H. AND BENCHIMOL, S., Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol*, 1998. 8(5): p. 279-82.
- WANG, J., XIE, L.Y., ALLAN, S., BEACH, D. AND HANNON, G.J., Myc activates telomerase. *Genes Dev*, 1998. 12(12): p. 1769-74.
- WANG, J., HANNON, G. AND BEACH, D., Risky immortalization by telomerase. *Nature*, 2000. 405: p. 755-756.

- WATSON, J.D., Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, 1972. 239: p. 197-201.
- WEINRICH, S.L., PRUZAN, R., MA, L., OUELLETTE, M., TESMER, V.M., HOLT, S.E., BODNAR, A.G., LICHTSTEINER, S., KIM, N.W., TRAGER, J.B., TAYLOR, R.D., CARLOS, R., ANDREWS, W.H., WRIGHT, W.E., SHAY, J.W., HARLEY, C.B. AND MORIN, G.B., Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet*, 1997. 17(4): p. 498-502.
- WENG, N.P., LEVINE, B.L., JUNE, C.H. AND HODES, R.J., Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *J Exp Med*, 1996. 183(6): p. 2471-9.
- WENZ, C., ENENKEL, B., AMACKER, M., KELLEHER, C., DAMM, K. AND LINGNER, J., Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO Journal*, 2001. 20(13): p. 3526-3534.
- WICK, M., ZUBOV, D. AND HAGEN, G., Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene*, 1999. 232(1): p. 97-106.
- WRIGHT, W.E., SHAY, J.W. AND PIATYSZEK, M.A., Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res*, 1995. 23(18): p. 3794-5.
- WRIGHT, W.E., PIATYSZEK, M.A., RAINEY, W.E., BYRD, W. AND SHAY, J.W., Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*, 1996. 18(2): p. 173-9.
- WRIGHT, W.E., TESMER, V.M., HUFFMAN, K.E., LEVENE, S.D. AND SHAY, J.W., Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev*, 1997. 11(21): p. 2801-9.
- WU, K.J., GRANDORI, C., AMACKER, M., SIMON-VERMOT, N., POLACK, A., LINGNER, J. AND DALLA-FAVERA, R., Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet*, 1999. 21(2): p. 220-4.
- XU, D., GRUBER, A., PETERSON, C. AND PISA, P., Suppression of telomerase activity in HL60 cells after treatment with differentiating agents. *Leukemia*, 1996. 10(8): p. 1354-7.
- YAHATA, N., OHYASHIKI, K., OHYASHIKI, J.H., IWAMA, H., HAYASHI, S., ANDO, K., HIRANO, T., TSUCHIDA, T., KATO, H., SHAY, J.W. AND TOYAMA, K., Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst*, 1998. 90(9): p. 684-90.
- YEGOROV, Y.E., CHERNOV, D.N., AKIMOV, S.S., BOLSHEVA, N.L., KRAYEVSKY, A.A. AND ZELENIN, A.V., Reverse transcriptase inhibitors suppress telomerase function and induce senescence-like processes in cultured mouse fibroblasts. *FEBS Lett*, 1996. 389(2): p. 115-8.
- YOSHIDA, K., SUGINO, T., GOODISON, S., WARREN, B.F., NOLAN, D., WADSWORTH, S., MORTENSEN, N.J., TOGE, T., TAHARA, E. AND TARIN, D., Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. *Br J Cancer*, 1997. 75(4): p. 548-53.
- YOSHIDA, K., SUGINO, T., TAHARA, H., WOODMAN, A., BOLODEOKU, J., NARGUND, V., FELLOWS, G., GOODISON, S., TAHARA, E. AND TARIN, D., Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer*, 1997. 79(2): p. 362-9.
- ZAHLER, A.M. AND PRESCOTT, D.M., DNA primase and the replication of the telomeres in *Oxytricha nova*. *Nucleic Acids Res*, 1989. 17(15): p. 6299-317.
- ZAHLER, A.M., WILLIAMSON, J.R., CECHE, T.R. AND PRESCOTT, D.M., Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature*, 1991. 350(6320): p. 718-20.
- ZAKIAN, V.A., Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet*, 1989. 23: p. 579-604.

Lebenslauf

Name: Susanne Meyer-Neumühlen
Geburtsdatum: 30. Mai 1975
Geburtsort: Frankfurt am Main
Adresse: 4517 NW 37th Terrace, Gainesville, FL 32605, *USA*
Ulmenweg 9, 63486 Bruchköbel
Eltern: Kurt Wilhelm Meyer-Neumühlen
Sybille Meyer-Neumühlen, geb. Svara

Schulbildung:

1981 - 1985 Grundschohle Süd Bruchköbel
1985 - 1987 Brüder-Grimm-Schohle Hanau
1987 - 1991 Hohe Landesschohle Hanau
1991 - 1992 Horizon High School, Brighton, Colorado, *USA*
1992 US High School Diploma
1992 - 1995 Hohe Landesschohle Hanau
1995 Abitur, Note 1.0

Universitätsausbildung:

1995 - 2002 **Philipps-Universität Marburg**, Studium der Humanmedizin
März 1998 **St. Vinzenz-Krankenhaus**, Famulatur in Chirurgie, Hanau
August und September 1998 **University of Wisconsin, Marshfield Clinic**, Famulatur in Innere Medizin (Gastroenterology and Infectious Disease), Marshfield, WI, *USA*
September und Oktober 1999 **King Edward VII Memorial Hospital**, Famulatur in Emergency Medicine und Chirurgie, Hamilton, *Bermuda*
August 2000 **Karl-Rupprechts-Universität**, Famulatur in Neurologie, Heidelberg
April bis Juni 2001 **Louisiana State University**, Praktisches Jahr, Tertian in Neurologie, New Orleans, LA, *USA*
August bis Dezember 2001 **University of Stellenbosch**, Praktisches Jahr, Tertian in Chirurgie Tygerberg Hospital, Tygerberg, *Südafrika*

Facharztausbildung:

ab Juli 2002 University of Florida, Gainesville, Florida, *USA*
AIP und Facharztausbildung Neurologie, Department of Neurology mit Internship in Innerer Medizin

Auszeichnungen:

- 1995 Auszeichnung des Verbandes der Chemischen Industrie
Bestes Abitur mit Chemie als Leistungskurs
- 1995 - 2002 Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

Forschung & Publikationen:

- Oktober 1998 bis Dissertation
Dezember 2000 *“Optimierung eines Verfahrens zum Nachweis erhöhter
Telomeraseaktivität in zytologischem Punktionsmaterial”*
Molekulare Onkologie, Prof. Dr. Marcus Schuermann,
Klinik für Innere Medizin, Abteilung Hämatologie/Onkologie
- 2001 Poster: K. Wittstock, **S. Meyer-Neumuehlen**, M. Kersting, S. Panku-
weit, B. Maisch, A. Neubauer, M. Schuermann:
“Telomerase Activity in Pericardial Effusions: Diagnostic Significance”
Poster Session DGHO-Kongress Mannheim, 30.09. - 03.10. 2001

Journal Publikation in Arbeit

Arbeitserfahrung:

- 1996 - 1997 Strahlenklinik, Städtische Kliniken Offenbach
Studentische Aushilfe im Pflegedienst
- März 1996 und CeBIT, Hannover
März 1997 Ausstellungsassistentin und Hostess für CANON Digitale
Kopiersysteme
- 1997 - 1999 Neurochirurgische Intensivstation, Universitätsklinikum Marburg
Studentische Aushilfe im Pflegedienst
- 2000 Kursus der Speziellen Pharmakologie, Universität Marburg
Hilfswissenschaftlerin und Kurstutorin
- 1998 - 2001 Medi-Learn Marburg
Dozentin und Tutorin in Chemie bei Vorbereitungsseminaren für
das Physikum sowie Examensauswertung

Extrakurrikuläre Aktivitäten:

- 1991 - 1992 High-School Austauschschülerin, Thornton, CO, USA
- 1995 - 1997 Mitarbeit in der Fachschaft für Medizin, Universität Marburg

Persönliche Interessen und Hobbies:

Sprachen: Deutsch/Englisch zweisprachig
Französisch/Spanisch gute Sprachkenntnisse

Tennis:
1992 Colorado State Tennis Champion No. 2 Einzel
1992 Colorado All State Team in Tennis
1981 - heute Mannschaftsspielerin Tennis, u.a. in Verbands- und Gruppenliga Hessen

Computer: Sehr gute Kenntnisse und Erfahrungen in Microsoft Office, Adobe, Lotus und digitale Bildverarbeitung

Klavier: Paul-Hindemith Musikschule Hanau,
14 Jahre klassische Klavierausbildung

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren:

in *Marburg*:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Bertalanffy, Christiansen, Doss, Engel, Feuser, Geus, Gotzen, Griss, Gröne, Habermehl, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Kern, Klenk, Koolman, Krieg, Lang, Lange, Lennartz, Maisch, Moosdorf, Neubauer, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Szczubayko, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, Westermann, von Wichert

in *Marshfield, Wisconsin, USA*:

Haselby, Kirchner, Mazza, Sell, Spellman,

in *Hamilton, Bermuda*:

Spangenberger

in *New Orleans, Louisiana, USA*:

England, Fisch, Gould, Gutierrez, Sumner, Turkewitz

in *Stellenbosch/Tygerberg, Republik Südafrika*:

Apffelstaedt, du Toit, Moore, van Wyk

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Marcus Schuermann, möchte ich für die freundlichen Überlassung des Themas und die Möglichkeit des selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens in der Arbeitsgruppe für Molekulare Onkologie in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie danken. Vor allem danken möchte ich ihm aber für die Unterstützung als Doktorvater bei der Durchführung der Experimente, bei der Beratung und Hilfe bei den organisatorischen Aspekten dieser Arbeit, wie z.B. der Probenasservation und für die zügige und sorgfältige Korrektur dieser Promotion. Seine Präsenz und Ansprechbarkeit - eine Eigenschaft, die viele Kollegen bei ihrem Doktorvater sehr vermissen - wußte ich immer zu schätzen. Mein Dank gilt ihm aber auch bei seiner Unterstützung hinsichtlich meiner Auslandsaufenthalte im Rahmen meines Studiums und bei meiner Bewerbung um eine AIP und Facharztstelle in den USA, die nicht zuletzt auch wegen Prof. Schuermanns Empfehlungsschreiben erfolgreich verlief.

Besonderer Dank gilt meinem direkten Betreuer Herrn Dipl.Humanbiol. Michael Kersting. Mit viel Geduld und Einfühlungsvermögen hat er mich anfangs in die experimentelle Molekularbiologie eingearbeitet. Seine zahlreichen Anregungen auf theoretischem und praktischen Gebiet waren nicht nur hilfreich, sondern entscheidende Impulsgeber bei der Entwicklung und Fertigstellung der Arbeit. Als Ansprechpartner nicht nur für fachliche Dinge sondern auch als ein Freund war Michael über meine Jahre "im Labor" und darüber hinaus eine wichtige Person geworden.

Gesondert erwähnen möchte ich auch Frau Dr. med. Alison Kraus. Sowohl auf fachlichem als auch auf menschlichem Gebiet stellte sie eine bedeutende Unterstützung dar. Mit großer Bewunderung für ihre immer freundliche Art und positive Lebenseinstellung als auch für ihre exzellente Fachkundigkeit sehe ich in ihr ein Vorbild. Auch sie unterstützte mich bei meinen Bewerbungen um Auslandsaufenthalte während des Studiums und bei meiner USA-Bewerbung, wofür ich mich sehr bei ihr bedanken möchte.

Dem Zentrum für Innere Medizin und der Abteilung für Hämatologie und Onkologie danke ich für die Unterstützung bei der Probensammlung, der Bereitstellung von Zelllinien für die Experimente und der wissenschaftlichen Ideen Anregung im Rahmen der hämatologisch-onkologischen Laborseminare.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung nicht nur auf finanzieller Hinsicht, sondern vor allem auf moralischem Gebiet. Sie waren der feste Anker, ohne den dieses Studium und diese Arbeit nicht in dieser Art durchführbar gewesen wäre. Besonders während des

schriftlichen Verfassens dieser Arbeit war ihre Geduld mit mir sehr wertvoll. Meiner Mutter danke ich für das konstruktive Korrekturlesen.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Studiums und für die Verlängerung meines Stipendiums aufgrund dieser experimentellen Arbeit.

Speziellen Dank gilt meinem Verlobten Herrn Dr. med. Jochen Mühlshlegel. Er nahm sich der undankbaren Aufgabe an, diese Arbeit Korrektur zu lesen. Am wichtigsten für meine Motivation und somit das Gelingen dieser Arbeit waren aber sein großes Verständnis, seine Geduld und seine Präsenz im Hintergrund, und dafür danke ich ihm besonders.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel »*Optimierung eines Verfahrens zum Nachweis erhöhter Telomeraseaktivität in zytologischem Punktionsmaterial*« im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Hämatologie / Onkologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr.med Marcus Schuermann mit Unterstützung durch Herrn Dipl.Humanbiologen Michael Kersting und Frau Dr.med Alison Kraus ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 28. 11. 2002